

MANOELA DE SOUZA DOMINGUES

CITOGENÉTICA COMPARATIVA DE *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski, 2000
DO ALTO RIO TIBAGI E ALTO RIO IGUAÇU

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção de grau de Mestre em Genética, Curso de
Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni

Co-orientadora: Prof. Dra. Marta Margarete Cestari

CURITIBA

2005



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Programa de Pós-Graduação em Genética

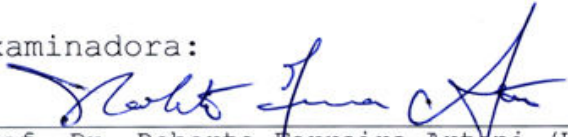
P A R E C E R

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a que se submeteu **MANOELA DE SOUZA DOMINGUES**, para fins de adquirir o título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".


Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 23 de fevereiro de 2006.


Banca Examinadora:




Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG)
Orientador e Presidente



Prof. Dr. Vinícios Abilhoa (Museu de História Natural Capão da Imbuia da Prefeitura Municipal de Curitiba)
Membro




Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida (UEPG)
Membro "ad hoc"



Profa. Dra. Marta Margarete Cestari (UFPR)
Membro

Visto:



Profa. Dra. Chirlei Glienke-Blanco
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Pós-Graduação em Genética, pela oportunidade em realizar esta pesquisa.

A CAPES pela bolsa de estudo fornecida.

Ao Professor Roberto Ferreira Artoni, que além de orientador tornou-se um querido amigo sempre muito dedicado e paciente, ainda, minha admiração por ser um grande pesquisador amante de sua profissão.

A Professora Marta Margarete Cestari pelas boas críticas, sugestões e empréstimo de referências que contribuíram muito para a realização da pesquisa.

Ao pesquisador Vinícius Abilhoa pela grande ajuda, identificação e orientação na realização da pesquisa morfométrica.

A Professora Mara Almeida pelas críticas e sugestões que contribuíram para a realização do trabalho.

Ao querido amigo Marcelo Vicari pela dedicação, experiência e instrução nas técnicas citogenéticas.

A querida amiga Daniele Matoso e sua família pela hospedagem e agradáveis conversas em Ponta Grossa.

Aos queridos amigos Miguel, João, Ernani, e Micheli do Laboratório de Citogenética e Evolução da UEPG, pelas conversas e dicas.

Aos funcionários da Fazenda do Canguiri, em especial a Mauren pela atenção e autorização na realização de coletas.

As grandes e inesquecíveis amigas Roxane Schena e Maria Claudia Ipucha pelas conversas, desabafos, risadas e conselhos durante o tempo em que estivemos juntas.

Ao querido amigo Daniel Kantek pela amizade e instrução no início da pesquisa.

Aos queridos amigos, Rafael, Cristiane, Wanessa, Thaís, Thaynah, Maria Cristina, Roger, Adriano, Felipe, Nédia e a todos os outros que pertencem ou que já

pertenceram ao Laboratório de Citogenética Animal da UFPR, pela agradável convivência e amizade.

A todos os amigos do Departamento de Genética da UFPR, professores, alunos e funcionários pelas conversas e divertimentos.

A Hiroko Nitta grande amiga e professora que sempre me apoiou nos estudos em Genética.

Agradeço especialmente ao meu esposo Juliano Sonehara pela grande ajuda e super empolgação nas pescarias, nas coletas dos lambaris, pela paciência, carinho, apoio, incentivo e amor durante minha caminhada.

Agradeço especialmente também a meus pais Claudio e Sônia, irmãs Marina e Marília, ao cunhado Rafael e ao fofinho sobrinho Caio, que sempre estiveram presentes nos momentos de alegrias e dificuldades, apoiando e orientando meus caminhos, contribuindo muito para minha formação profissional, emocional e espiritual.

A todos aqueles que não foram citados acima, mas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo que o cerca – uma espécie de ilusão de ótica de sua consciência, moldado pela cultura. E essa ilusão é um tipo de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Poderá ser que ninguém consiga atingir plenamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
LISTA DE TABELA	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 CARACTERIZAÇÃO HISTÓRICA E GEOMORFOLÓGICA DO ALTO RIO TIBAGI E ALTO RIO IGUAÇU RESSALTANDO ASPECTOS DA DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE PEIXES LOCAIS	01
1.2 SISTEMÁTICA E DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA CHARACIDAE COM ÊNFASE NO GÊNERO <i>Astyanax</i>	06
1.3 ESTADO ATUAL DA CITOGENÉTICA DE <i>Astyanax</i> COM ÊNFASE EM <i>Astyanax altiparanae</i>	09
1.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS POPULAÇÕES DE <i>Astyanax altiparanae</i> DO ALTO RIO TIBAGI E ALTO RIO IGUAÇU	11
2 OBJETIVOS	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 MATERIAL E LOCAIS DE COLETAS	15
3.2 MÉTODOS	18
3.2.1 Obtenção de metáfases mitóticas	18
3.2.1.1 Obtenção de metáfases mitóticas – método direto “ <i>in vivo</i> ”, segundo BERTOLLO; TAKAHASHI e MOREIRA-FILHO (1978)	18
3.2.1.2 Obtenção de metáfases mitóticas – método indireto “ <i>in vitro</i> ”, segundo FENOCCHIO <i>et al.</i> , (1991)	20
3.2.2 Método de coloração convencional - Giemsa	21
3.2.3 Estudos Cariotípicos	21
3.2.4 Identificação cromossômica	22
3.2.5 Coloração das regiões organizadoras de nucléolos Ag-RONs	22
3.2.6 Detecção da heterocromatina - Bandas CBG	23

3.2.7	Coloração pelo fluorocromo Cromomicina A ₃ (GC específico) contra-corado com o fluorocromo DAPI (AT específico).....	23
3.2.8	Hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH) com sondas de rDNA 18S e 5S.....	24
3.2.9	Parâmetros Morfométricos	29
4	RESULTADOS	32
4.1	DADOS CARIOTÍPICOS	32
4.2	DADOS MORFOMÉTRICOS.....	33
5	DISCUSSÃO	40
5.1	COMPARAÇÕES CARIOTÍPICAS NO GÊNERO <i>Astyanax</i> COM ÊNFASE EM <i>Astyanax altiparanae</i>	40
5.2	COMPARAÇÕES MORFOMÉTRICAS E INTEGRAÇÃO COM DADOS CARIOTÍPICOS EM <i>Astyanax altiparanae</i> DO ALTO RIO TIBAGI E ALTO RIO IGUAÇU.....	46
6	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – EXEMPLAR DE <i>Astyanax altiparanae</i> . A BARRA REPRESENTA 3cm.....	15
FIGURA 2 – MAPA DO ESTADO DO PARANÁ COM DESTAQUE PARA OS LOCAIS DE COLETA NOS RIOS TIBAGI (■) E IGUAÇU (▲).....	16
FIGURA 3 – ASPECTO DA LAGOA TARUMÃ DO PARQUE ESTADUAL DE VILA VELHA NA BACIA DO ALTO RIO TIBAGI (a) E DO LOCAL DE COLETA NA FAZENDA EXPERIMENTAL DO CANGUIRI NA BACIA DO ALTO RIO IGUAÇU (b).....	17
FIGURA 4 – CARACTERES MORFOMÉTRICOS EM <i>Astyanax altiparanae</i>	31
FIGURA 5 - CARIÓTIPOS DE <i>Astyanax altiparanae</i> PROVENIENTES DO ALTO RIO TIBAGI (A) E ALTO RIO IGUAÇU (B).....	35
FIGURA 6 – METÁFASES MITÓTICAS DE <i>Astyanax altiparanae</i> DO ALTO RIO TIBAGI (a e c) E ALTO RIO IGUAÇU (b e d). REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLEÓLOS MARCADAS COM NITRATO DE PRATA (a; b); REGIÕES HETEROCROMÁTICAS EVIDENCIADAS PELO BANDAMENTO C (c; d).....	36

FIGURA 7 - METÁFASES MITÓTICAS DE *Astyanax altiparanae* DO ALTO RIO TIBAGI E ALTO RIO IGUAÇU. REGIÕES HETEROCROMÁTICAS EVIDENCIADAS COM CROMOMICINA A₃/DAPI (a; b); HIBRIDAÇÃO *in situ*, REGIÃO 18S (c; d); HIBRIDAÇÃO *in situ*, REGIÃO 5S (e; f).....37

FIGURA 8 – PROJEÇÃO DOS ESCORES INDIVIDUAIS NOS DOIS PRIMEIROS EIXOS DA ANÁLISE DAS VARIÁVEIS CANÔNICAS LIVRES DO TAMANHO, DAS AMOSTRAS COMBINADAS DE *Astyanax altiparanae* DO ALTO RIO TIBAGI (2, N = 36), E DO ALTO RIO IGUAÇU (1, N = 37).....38

FIGURA 9 – CITÓTIPOS DE *Astyanax altiparanae* ENCONTRADOS NA BACIA DOS RIOS TIBAGI E IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL.....43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESCORES DAS VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS NOS EIXOS CANÔNICOS DAS AMOSTRAS DE <i>Astyanax altiparanae</i> DO ALTO RIO TIBAGI E ALTO RIO IGUAÇU.....	39
--	----

RESUMO

A bacia do alto rio Tibagi está localizada na porção centro-leste do Paraná, possui 65 tributários principais e sua nascente está situada na região de Ponta Grossa. Apresenta uma grande diversidade de peixes, onde predominam Characiformes e Siluriformes. A espécie *Astyanax altiparanae* é encontrada em afluentes e subafluentes desta bacia. A bacia do alto rio Iguaçu está localizada na porção da margem esquerda do curso médio do rio Paraná, possui 103 tributários, sua nascente está situada nas vertentes ocidentais da Serra do Mar e apresenta uma ictiofauna pobre e com alto grau de endemismo, também com predomínio de Characiformes e Siluriformes. Recentemente, *Astyanax altiparanae* tem sido encontrada ao longo da bacia do rio Iguaçu, a qual não havia sido registrada até 1983, por isso discute-se sobre sua origem. A espécie *Astyanax altiparanae* apresenta número diplóide $2n=50$ cromossomos com diferença em suas fórmulas cariotípicas e no número de cromossomos portadores de regiões organizadoras de nucléolos. Neste trabalho foi caracterizado o cariótipo de *Astyanax altiparanae* de uma população do alto do rio Tibagi e outra do alto rio Iguaçu, através de coloração convencional Giemsa, bandamento C, Ag-RONs, fluorocromo base-específico (cromomicina A_3) e hibridação *in situ* com sondas de rDNA 18S e 5S. Também foram avaliadas características morfológicas morfométricas diagnósticas nestas duas populações para a composição dos eixos das variáveis canônicas livres de tamanho. As abordagens citogenética e morfológica foram congruentes e apontam para a sobreposição comparável de vários marcadores entre estas populações e destacam exclusividades que refletem o nível de populações isoladas. Desta forma, e contrariamente a estudos que indicam fluxo gênico entre populações de *A. altiparanae* do baixo rio Iguaçu com afluentes do rio Paraná, espera-se que diferentes estoques populacionais desta espécie ocorram ao longo das bacias dos rios Tibagi e Iguaçu isoladamente, refletindo uma história evolutiva complexa.

ABSTRACT

The upper rio Tibagi basin is located in the center-east of Paraná State and possess 65 main tributaries and headwater occur at East of Ponta Grossa region. It shows a great fish diversity with Characiformes and Siluriformes prevalence. The *Astyanax altiparanae* species is found in smaller tributaries of this basin. The upper rio Iguaçu basin is located in the left margin of the medium course of the rio Paraná, it possess 103 tributaries and headwater occur at East of the Serra do Mar mountain. It shows a poor ichthyofauna with high endemism degree, also with Characiformes and Siluriformes prevalence. Recently, *Astyanax altiparanae* has been found in the rio Iguaçu basin, being not registered up to 1983, for that it is discussed there origin. The *Astyanax altiparanae* species show diploid number with $2n=50$ chromosomes and difference in their karyotypic formula and the chromosomes bearing the nucleolar organizing regions. In this work the *Astyanax altiparanae* karyotype of upper rio Tibagi and upper rio Iguaçu basins populations was characterized, using conventional stain with Giemsa, and differential with C-banding, Ag-NORs, base-specific fluorochrome (chromomycin A₃) and *in situ* hybridization with rDNA 18S and 5S probes. Diagnostics morphometric characteristics in these two populations were analyzed to compose the axes of the free size canonical variables. The cytogenetics and morphological approaches were coincident and show comparable overlap of several markers among these populations and exclusiveness that reflect the level of isolated populations. Like This, and in opposition to studies that indicate gene flow among *A. altiparanae* populations in the low rio Iguaçu with tributaries of the rio Paraná, it is waited that different populational stocks (regional variations) of this species occur along the basins of the Tibagi and Iguaçu rivers, individually, reflecting a complex evolutionary history.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÃO HISTÓRICA E GEOMORFOLÓGICA DO ALTO RIO TIBAGI E ALTO RIO IGUAÇU RESSALTANDO ASPECTOS DA DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE PEIXES LOCAIS

Uma bacia hidrográfica pode ser entendida como uma área onde a precipitação é coletada e conduzida para seu sistema inter-relacionado de drenagem natural, onde o movimento da água superficial inclui todos os usos dela e do solo, existentes na localidade (MAGALHÃES, 1989).

A bacia do rio Tibagi está localizada na porção centro-leste do Paraná, coordenadas geográficas 22°47'22" e 25°36'25" de latitude sul, 49°36'00" e 51°27'36" de longitude oeste, tem área aproximada de 25.000 km², o que corresponde a cerca de 13% da área do estado, abrangendo o primeiro, o segundo e o terceiro planalto Paranaense. Limita-se ao norte com a bacia do rio Paranapanema, sendo considerado seu principal afluente (STIPP, 2002), a leste com as bacias dos rios Cinzas e Itararé, a sudeste com a bacia do rio Ribeira, ao sul com a bacia do rio Iguaçu, a oeste com a bacia do rio Ivaí e a noroeste com a bacia do rio Pirapó (DE FRANÇA, 2002). A bacia do rio Tibagi possui 65 tributários principais e sua nascente está situada na região de Ponta Grossa (PR), atravessa o estado em direção norte, até desembocar no rio Paranapanema (PINESE, 2002).

A bacia hidrográfica do Tibagi está geologicamente inserida em parte da Bacia Sedimentar do Paraná, que corresponde a uma extensa depressão deposicional situada na parte centro-leste do continente sul-americano, cobrindo cerca de 1,6 milhão de km², bem como uma pequena parcela do embasamento cristalino Paranaense. Segundo MAACK (1981), o curso superior do rio Tibagi é influenciado por juntas estruturais característica dos arenitos da Formação Furnas, acompanhando ao longo de 42 km uma fenda estrutural vertical, retilínea e profunda. Esta bacia apresenta no seu leito, corredeiras, quedas-d'água e ilhas rochosas. Como um rio cataclinal, ao cruzar a área

de contato das rochas efusivas e das rochas sedimentares, trabalhou gerando gargantas profundas e largas, onde atualmente o rio apresenta o leito estreito em relação à largura da passagem. Essa é uma evidência importante de que o rio Tibagi sofreu uma superimposição provocada pela epirogênese positiva durante o Cenozóico, que, por sua vez, provocou o soerguimento generalizado da Plataforma Brasileira nessa região (JUSTUS, 1990).

A bacia do rio Tibagi apresenta uma grande diversidade de peixes e esta tende a aumentar da nascente em direção a foz. Mas o que se verifica é que, embora ainda exista riqueza de espécies, cerca de 110 descritas até o presente, muitas tiveram sua abundância reduzida. Grande parte dessa situação é consequência de alterações ambientais causadas pela destruição das florestas ciliares, pelo não-tratamento de efluentes urbanos, pela falta de controle e de cuidados na aplicação de defensivos agrícolas (SHIBATTA *et al.*, 2002), e pela construção de represas. Essas ações antrópicas têm provocado respostas ambientais diversas, como a modificação da dinâmica da água, a sucessão de comunidades e a extinção de espécies (CECILIO *et al.*, 1997). Além do que, nessas novas condições, o comprometimento das áreas de desova, rotas migratórias e fontes de alimento, acarretam transtornos à maioria dos peixes. Em relação à alimentação, muitas espécies modificam seus hábitos alimentares em resposta a alterações na disponibilidade temporal do alimento. Isso ocorre principalmente com aquelas dotadas de elevada plasticidade alimentar, enquanto outras chegam a extremos de serem localmente extintas (CASSEMIRO; HAHN e FUGI, 2002).

Todas as espécies registradas, desde 1989, para a bacia do rio Tibagi pertencem à subclasse Actinopterygii e, principalmente, a superordem Ostariophysi. No que se refere ao número de espécies pertencentes a cada ordem, verifica-se um padrão semelhante ao encontrado para o alto rio Paraná, predominando Characiformes e Siluriformes, com cerca de 42,7% do total de espécies já descritas. Salvo algumas introduções pelo homem, a bacia do rio Tibagi provavelmente ainda mantém muito da sua ictiofauna original, isto devido ao seu isolamento do rio Paraná em função da usina hidrelétrica da represa Capivara, cuja construção é anterior (início de funcionamento

em 1975) à da barragem de Itaipu (início de funcionamento em 1984) (SHIBATTA *et al.*, 2002). Contudo, mesmo com o volume de informações a cerca da diversidade e distribuição dos peixes do baixo Tibagi, necessita-se de maior ênfase no conhecimento da ictiofauna do médio e alto Tibagi, especialmente na região dos Campos Gerais (ARTONI e ALMEIDA, 2001).

A espécie *Astyanax altiparanae* foi encontrada em afluentes e subafluentes da bacia do rio Tibagi, esta espécie apresenta grande flexibilidade alimentar, ingerindo principalmente insetos e sementes. LOBON-CERVIÁ e BENNEMANN (2000) mostraram que alguns itens de sua dieta refletem a sazonalidade de recursos alimentares abundantes. Segundo SHIBATTA *et al.* (2002) a espécie *A. altiparanae* é oportunista, pois aproveita melhor os recursos sazonais.

A bacia do rio Iguaçu está localizada na porção da margem esquerda do curso médio do rio Paraná, integrando a porção setentrional da província Paraná-Platense, de acordo com a caracterização das áreas ictiológicas da América do Sul. Constitui ainda, o mais meridional dos tributários brasileiros do rio Paraná. Esta bacia estende-se por 72.000 km², sendo 57.330 km² pertencentes ao estado do Paraná, 13.470 km² ao estado de Santa Catarina, totalizando 70.800 km² em território brasileiro e 1.200 km² na Província de Misiones, em território Argentino (SEVERI e CORDEIRO, 1994). Ao longo de seus 910 km de extensão, desde as suas cabeceiras na porção Ocidental da Serra do Mar até sua foz no rio Paraná, o rio Iguaçu percorre o estado do Paraná até União da Vitória no sentido NE-SO para então servir de limite natural do estado de Santa Catarina e tomar rumo atravessando deste modo diferentes regiões naturais individualizadas pela geomorfologia, geologia, solos, clima e vegetação (MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA, 1990).

As nascentes do rio Iguaçu possuem duas regiões distintas, uma incluindo suas origens propriamente ditas, na confluência dos rios Atuba e Iraí e outra formada pelo conjunto das bacias dos rios Negro e da Várzea. A região conhecida por “Alto Iguaçu” não possui definição formal de seus limites aceitando-se que compreenda o trecho desde as suas nascentes, em Curitiba, até o início de suas corredeiras no município de Porto Amazonas (INGENITO; DUBOC e ABILHOA, 2004). O Planalto Meridional,

drenado pelo rio Iguaçu, é constituído por uma sucessão de planaltos cujas altitudes diminuem à medida que se caminha para o rio Paraná. O rio Iguaçu recebe 61 afluentes em sua margem direita e 42 na margem esquerda (MAACK, 1981). A maioria de seus afluentes é subsequente, isto é, aproximadamente perpendiculares, uma vez que estabeleceram-se posteriormente nas áreas de fraqueza existentes no contato de diferentes camadas ou nas linhas de falhas e em diáclases. Entre seus principais afluentes estão os rios Negro, Potingá, Jordão, Chopim, Cavernosos e Andrada (MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA, 1990). O processo geomorfológico de formação da bacia do Iguaçu remonta ao Terciário, estando associado a movimentos verticais escalonados responsáveis pelo soerguimento da Serra do Mar e a origem dos três planaltos Paranaenses sendo: o primeiro na região de Curitiba, o segundo na região de Ponta Grossa/Palmeira e o terceiro na região de Guarapuava/Palmas. O Iguaçu constitui-se assim num rio geologicamente antigo, porém rejuvenescido por levantamentos diversos, caracterizados por corredeiras e saltos, alternados por meandros de curvaturas amplas e várzeas extensas.

Devido ao surgimento das Cataratas do Iguaçu, ocorrido há aproximadamente 22 milhões de anos (período Oligo-Mioceno), as populações de peixes da bacia do rio Iguaçu foram isoladas das do rio Paraná por estas quedas, que apresentam cerca de 70m de desnível (HASEMAN, 1911, *apud* SAMPAIO, 1988). Tal fato favoreceu um processo de especiação, que seria responsável pelo considerável grau de endemismo apresentado por sua ictiofauna (KANTEK; FENOCCHIO e CESTARI, 2003). A partir de 1968, grandes modificações começaram a ocorrer na bacia do rio Iguaçu, devido à construção de barragens para aproveitamento hidroelétrico (ELETROSUL, 1977).

O rio Iguaçu apresenta uma ictiofauna pobre comparada à do rio Paraná (GOODLAND, 1975), isto se deve principalmente a topografia do rio, com suas quedas e corredeiras, que impossibilitam a subida de peixes e a realização de migrações. Contudo, este rio apresenta 103 tributários como locais de migração e alimentação, os quais representam importantes refúgios para peixes migradores. Além disso, são trechos de ambientes lênticos que ajudam no desenvolvimento de tais populações.

A ictiofauna do rio Iguaçu é caracterizada pelo número pequeno de espécies, cerca de 81 espécies de Teleostei conhecidas até o presente, pela ausência de inúmeras famílias de peixes comuns na bacia do rio Paraná e pelo elevado grau de endemismo, o qual foi estimado em 75% (INGENITO; DUBOC e ABILHOA, 2004; ZAWADZKI; RENESTO e BINI, 1999). Contudo, predominam Characiformes e Siluriformes, representando 80,4% das espécies atuais (SEVERI e CORDEIRO, 1994). Aproximadamente 80% das espécies são exclusivas desta bacia hidrográfica e não existem em qualquer outra parte do planeta (AGOSTINHO e GOMES, 1997). A maior parte das informações mais recentes sobre o rio Iguaçu refere-se aos trechos médio e inferior (respectivamente segundo e terceiro planaltos paranaenses), onde se concentram diversos reservatórios formados pelas barragens de grandes usinas hidrelétricas, permanecendo o curso superior com escassez de informações relativas a ictiofauna (GARAVELLO; PAVANELLI e SUZUKI, 1997; INGENITO; DUBOC e ABILHOA, 2004).

Todas as espécies registradas até 1983, para a bacia do rio Iguaçu pertencem as superordens Ostariophysi, Atherinomorpha e Acanthopterygii e em nenhum dos registros foi encontrado o lambari *A. altiparanae*. Recentemente, esta espécie tem sido verificada ao longo da bacia do rio Iguaçu, por isso discute-se sobre sua origem, se esta foi introduzida, ou se nunca foi coletada antes ou se veio de algum tributário dos rios em que se encontram estes peixes. Segundo PRIOLI *et al.* (2002), para uma população de *A. altiparanae* do rio Iguaçu, amostrada em Salto Caxias a 200 km das Cataratas do Iguaçu, no terceiro planalto paranaense, não foi verificada condição de endemismo. Existe uma alta similaridade genética e alto fluxo gênico entre as populações de *A. altiparanae* dos tributários da bacia do alto rio Paraná com a população estudada do rio Iguaçu (PRIOLI *op. cit.*).

1.2 SISTEMÁTICA E DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA CHARACIDAE COM ÊNFASE NO GÊNERO *Astyanax*

A família Characidae faz parte da ordem Characiformes (FINK e FINK, 1981), representando aproximadamente 55% desta ordem. Engloba a maior parte dos peixes brasileiros de água doce, sendo que, na América do Sul, esta compreende cerca de 30 subfamílias e 250 gêneros (BRITSKI, 1972). O grande número de espécies incluídas nesta família, associado à imensa variedade de formas que ela apresenta, tem dificultado proposições de classificação que reflitam agrupamentos naturais dentro dela, de modo que as relações de parentesco com as demais famílias de Characiformes têm sido muito prejudicadas devido a dúvidas sobre o monofiletismo da família Characidae (LUCENA, 1993). Entretanto, não é somente o fator numérico que dá importância à família Characidae, pois entre os seus membros encontram-se elementos de alto valor econômico na pesca e piscicultura.

Nesta família as espécies apresentam hábitos alimentares muito diversificados e exploram uma grande variedade de habitats (BRITSKI; SATO e ROSA, 1998). As variações nas estratégias de vida, dos peixes Characiformes, estão presentes de forma muito evidente, tanto que este grupo exibe uma divergência fenotípica adaptativa tão grande que não se iguala a nenhuma outra ordem animal (FINK e FINK, 1981). Os peixes deste grupo são coletados com relativa facilidade na maioria dos cursos de água, tanto pela abundância de espécies como pelo grande número de espécimens em geral encontrados (DANIEL-SILVA, 1996). Geralmente, os representantes apresentam uma nadadeira caudal adiposa, são bons nadadores e possuem escamas, são conhecidos como lambaris, piracanjubas, piranhas, pacus, peixe-cachorro, dourado, entre outros. O tamanho pode variar desde dois centímetros, como os pequiras, até mais de um metro, como o dourado (BRITSKI, 1972).

As espécies desta família estão alocadas no Filo Chordata, Subfilo Vertebrata, Classe Osteichthyes, Subclasse Actinopterygii, Ordem Characiformes e Família Characidae (NELSON, 1994; REIS; KULLANDER e FERRARIS, 2003).

O gênero *Astyanax* é o mais comum e diversificado da família Characidae na área de abrangência da região neotropical, são conhecidos vulgarmente como lambaris ou piabas e habitam diversos ambientes inclusive as águas de cabeceiras de rios e riachos. O gênero congrega aproximadamente uma centena de espécies abundantes nas bacias hidrográficas brasileiras (GARUTTI e BRITSKI, 2000; LIMA *et al.*, 2003). Atualmente está alocado entre vários gêneros *incertae sedis* de Characidae, anteriormente nominados entre os Tetragonopterinae (LIMA *et al.*, 2003). Também revela estreitamente várias formas semelhantes, formando um complexo, do ponto de vista taxonômico (GARUTTI e BRITSKI, 2000). EIGENMANN em 1927 descreveu 74 espécies e subespécies, mas como se trata de um gênero com grande número de espécies, muito da sua taxonomia ainda permanece obscura e identificações incorretas aparecem com frequência na literatura. Na bacia do alto rio Paraná seis espécies de *Astyanax* foram descritas com base em caracteres morfológicos: *Astyanax paranahybae*, *Astyanax scabripinnis paranae*, *Astyanax schubarti*, *Astyanax trierythropterus*, *Astyanax bipunctialbicaudalis* e *Astyanax altiparanae* (GARUTTI e BRITSKI, op. cit.).

Recentemente, foi verificado que a espécie *Astyanax altiparanae* distribui-se pela bacia do alto rio Tibagi (SHIBATTA *et al.*, 2002) e bacia do alto rio Iguaçu (GRAÇA e PAVANELLI, 2002). Anteriormente esta foi identificada como *Astyanax bimaculatus*, por apresentar alguns caracteres deste grupo, como mancha negra horizontalmente ovalada, associada a duas barras verticais marrons, situadas na região umeral, e uma mancha negra no pedúnculo caudal estendida até a extremidade dos raios caudais medianos. Entretanto, verificou-se que *A. bimaculatus* é próprio da bacia Amazônica (GARUTTI, 1995), mas ocorre também nas bacias dos rios São Francisco, alto Paraná, baixo Paraná-Paraguai, Uruguai, Paraíba do Sul, Ribeira de Iguape e Sistema da Laguna dos Patos. Enquanto que *Astyanax altiparanae* ocorre na bacia do alto rio Paraná, acima de Sete Quedas a exceção de um lote que procede de localidade situada abaixo de Sete Quedas (GARUTTI e BRITSKI, 2000).

Astyanax altiparanae caracteriza-se por apresentar o corpo prateado, com a região ventral esbranquiçada, a região dorsal é cinzenta e no flanco a faixa lateral

prateada raramente é visível. As nadadeiras caudal, anal e pélvicas são amareladas, enquanto as demais são hialinas ou levemente amareladas. Na caudal, ainda, há uma faixa mediana negra estendida à extremidade dos raios medianos, separando os lobos superior e inferior. A mancha umeral característica é azul cobalto, apresentando variação de tonalidades conforme o ângulo de incidência da luz. As duas barras verticais e a mancha do pedúnculo caudal são cinzas ou acinzentadas, sendo que a última apresenta reflexos azulados, também conforme incidência da luz. Acima da pupila, há uma mancha amarelo-ferrugem (GARUTTI e BRITSKI, 2000). Assim, esta espécie é conhecida popularmente por lambari relógio, tambiú e lambari-de-rabo-amarelo. Contudo, como esta espécie ocorre numa grande diversidade de microambientes, as populações desse lambari não são homogêneas quanto à morfologia.

A espécie é tipicamente oportunista, utilizando estratégias diferenciadas na estrutura da população (ORSI; SHIBATA e SILVA-SOUZA, 2002). Portanto, a elevada plasticidade alimentar de *Astyanax altiparanae*, bem como sua capacidade de reproduzir em vários ambientes, explicam o sucesso desta espécie no processo de colonização de novos habitats. Entretanto, observa-se uma preferência pela permanência em águas mais lânticas.

1.3 ESTADO ATUAL DA CITOGENÉTICA DE *Astyanax* COM ÊNFASE EM *Astyanax altiparanae*

Os peixes do gênero *Astyanax* têm apresentado uma grande diversidade cariotípica, com números cromossômicos variando de $2n=36$ em *Astyanax schubarti* (MORELLI *et al.*, 1983) a $2n=50$ em várias espécies como *Astyanax scabripinnis*, *Astyanax bimaculatus*, *Astyanax altiparanae* (OLIVEIRA *et al.*, 1988) entre outros.

Estudos citogenéticos realizados por MANTOVANI *et al.*, (2000), na espécie *A. scabripinnis* coletada em rios do Paranapanema, indicaram uma variação no número diplóide, entre populações distintas com $2n = 48$ e 50 cromossomos e no número fundamental de 84 a 86 . SOUZA e MOREIRA-FILHO (1995), verificaram divergências cariotípicas entre duas populações de *Astyanax scabripinnis* de diferentes altitudes do rio Piracuama, localizado na região de Campos do Jordão, SP. Embora o número diplóide fosse igual ($2n=50$), as diferenças para os exemplares de ambas populações, quanto aos tipos cromossômicos, foram muito marcantes demonstrando que os acidentes geográficos, como cachoeiras, presentes no ambiente em estudo, provavelmente atuaram como um fator de isolamento populacional efetivo. Outros estudos indicam que a diversidade cromossômica apresentada pelo “complexo *scabripinnis*” é bastante ampla, com cariótipos diferentes entre os exemplares de bacias hidrográficas distintas, como a do São Francisco e Paraná (MOREIRA-FILHO, 1989; MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991), do Ivaí, Paranapanema e Paraná (MIZOGUCHI e MARTINS-SANTOS, 1998), entre espécimes da mesma bacia hidrográfica em diferentes riachos (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, op. cit.; MAISTRO, 1992), entre populações isoladas de um mesmo riacho e entre populações simpátricas (SOUZA e MOREIRA-FILHO, op. cit.), caracterizando assim um processo de evolução cariotípica acentuado nesse grupo de peixes.

A maior parte dos estudos cariotípicos em *Astyanax* refere-se principalmente a *A. scabripinnis*; no entanto, várias outras espécies têm sido também estudadas sobre este aspecto. Estudos citogenéticos realizados em *Astyanax paraguayae*, *Astyanax*

intermedius e *Astyanax giton*, coletadas na bacia do rio Paraíba do Sul, mostraram $2n=48$ e $NF=86$, $2n=50$ e $NF=68$, $2n=50$ e $NF=72$, respectivamente (KAVALCO e MOREIRA-FILHO, 2003).

Em *Astyanax eigenmanniorum* foram relatados casos de triploidias naturais (FAUAZ; VICENTE e MOREIRA-FILHO, 1994), assim como a presença de cromossomos supranumerários (STRIPECK *et al.*, 1985), cuja frequência reflete uma característica do grupo verificada também em outras espécies (MOREIRA-FILHO e BERTOLLO, 1991; MAISTRO *et al.*, 1992; FAUAZ; VICENTE e MOREIRA-FILHO, op. cit.; MOREIRA-FILHO, GALETTI Jr e BERTOLLO, 2004).

ROBAINA e CESTARI, (1998) estudando uma espécie de *Astyanax* natural do rio Iguaçu conhecida como *Astyanax sp B*, determinaram $2n=50$ e $NF=86$. Outra espécie endêmica ao rio Iguaçu, nominalmente reconhecida como *Astyanax sp. C* apresentou em duas populações isoladas em afluentes do rio Iguaçu um mesmo número diplóide ($2n=50$ cromossomos), contudo ressaltou diferenças no padrão de localização da heterocromatina constitutiva e nas regiões organizadoras de nucléolos (KANTEK; FENOCCHIO; CESTARI, 2003). MATOSO *et al.* (2002), investigaram a constituição cariotípica de *Astyanax aff. fasciatus* (citado como *Astyanax sp.*) endêmica e altamente isolada em poços de desabamentos no Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa – Pr, Brasil, conhecidos como Furnas. Estes autores encontraram uma macroestrutura cariotípica semelhante à verificada em outros *Astyanax* dos grupos *scabripinnii* e *fasciatus*. No mesmo local, GROSS *et al.*, (2004) encontraram uma população de *Astyanax* que recentemente foi isolada evolutivamente e verificaram evidências morfológicas de deterioração da população indicando alto risco de extinção.

Em *Astyanax altiparanae*, algumas vezes citados na literatura como *A. bimaculatus*, FERNANDES e MARTINS-SANTOS (2004) citam 11 diferentes estudos em 26 populações destas espécies e evidenciam que o número diplóide verificado é constante e igual a $2n=50$ cromossomos em oposição à fórmula cariotípica que varia mais fortemente em relação aos cromossomos subtelocêntricos e acrocêntricos. Pouca informação é disponibilizada em relação à distribuição da

heterocromatina enquanto em relação ao número de cromossomos portadores de regiões organizadoras de nucléolos todas as populações apresentam RONS múltiplas a exceção de uma população do rio Paraná, região de Porto Rico, que apresentou RON simples evidenciada por impregnação com nitrato de prata (FERNANDES e MARTINS-SANTOS (2004). Ausência de estudos mais aprofundados de bandamentos cromossômicos e de hibridação *in situ* dificultam maiores comparações entre as populações desta espécie, a exemplo da localização de rDNA na população estudada por FERNANDES e MARTINS-SANTOS (op. cit.) na definição do real número de sítios de rDNA independente da sua atividade. O padrão de distribuição da heterocromatina também é pobre nesta espécie principalmente porque esta apresenta blocos heterocromáticos geralmente intersticiais e pouco conspícuos em alguns cromossomos submetacêntricos e subtelocêntricos (PAGANELLI, 1990; DANIEL-SILVA e ALMEIDA-TOLEDO, 2001; FERNANDES e MARTINS-SANTOS (op. cit.).

O gênero *Astyanax* apresenta uma extensa variabilidade em suas fórmulas cariotípicas as quais acompanham sua diversidade biológica sendo, desta forma, um grupo de organismos bastante interessante para estudos de biologia evolutiva.

1.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA COMPARATIVA EM PEIXES NEOTROPICAIS

A morfometria é uma análise da forma corporal em relação ao tamanho por meio de métodos numéricos. É uma análise usual em biologia evolutiva, além de propiciar a interpretação e comparação precisa dos padrões de variação de caracteres quantitativos (BLACKITH e REYMENT, 1971; CAVALCANTI e LOPES, 1990).

Diversas áreas do conhecimento têm se interessado pelos estudos morfométricos por motivos diferenciados. Os taxonomistas utilizam a morfometria para mensurar as diferenças existentes entre espécies, criando assim, referências para comparações. Os ecólogos discutem que a forma e o tamanho de um organismo devem

caracterizar mais precisamente aspectos como alimentação, microhabitat, pressão seletiva, competição e predação, visto que a morfometria de um organismo é o resultado final de sua evolução. Já os geneticistas se preocupam em estimar a herdabilidade de caracteres morfométricos, pois podem quantificar e separar as influências genotípicas das ambientais sob o fenótipo de uma população (PERES, *et al.*, 1995).

Os seres vivos são multidimensionais, onde no mínimo três vetores são necessários para descrever sua forma. E como esta é o resultado de diversas respostas alométricas (alterações nas proporções de um organismo ao longo do crescimento) durante o desenvolvimento, os estudos morfológicos devem ser desenvolvidos através de ferramentas multivariadas (CAVALCANTI e LOPES, 1993).

Os complexos padrões de variação morfométrica dos organismos, requerem o uso de técnicas de análise estatística multivariada, que permitem considerar simultaneamente a variação dos diversos caracteres quantitativos. Estas técnicas são extremamente úteis na ordenação dos dados morfométricos, permitindo que parâmetros biológicos subjacentes às relações morfológicas entre indivíduos, ou grupos, possam ser mais facilmente detectados e interpretados (CAVALCANTI e LOPES, 1993; REIS, 1988).

Com a disponibilidade de softwares estatísticos, estes têm contribuído para tornar as técnicas de análise estatística multivariada ainda mais amplamente acessíveis aos pesquisadores envolvidos em estudos de morfometria aplicados às várias áreas da biologia evolutiva e sistemática (CAVALCANTI e LOPES, 1993; BEMVENUTI e RODRIGUES, 2002).

A geometria de um organismo não é passível de descrição direta, entretanto é gerado um espaço simplificado, onde comparações relativas entre formas podem ser realizadas.

STRAUSS e BOOKSTEIN (1982) sugeriram um protocolo geométrico preciso para a quantificação da forma de organismos. Este protocolo foi realizado em peixes e denominado “rede de treliças” (*truss networks*), o qual possibilita a realização de medidas a partir da associação de pontos anatômicos (marcos) definidos com base

na morfologia externa, pressupondo-se a homologia dos mesmos entre as formas a serem comparadas.

A metodologia de redes de treliça, combinada com as técnicas de análise multivariada, tem demonstrado um grande potencial na investigação dos padrões de diferenciação morfológica e crescimento dos peixes. Também pode ser analisada a discriminação entre grupos intra-específicos ou populações geográficas, obtidas em conjunto com as variáveis medidas através da rede de treliça (SHIBATTA e GARAVELLO, 1993; CAMPELLO e BEMVENUTI, 2002).

Os estudos morfométricos têm sido realizados em peixes, tanto marinhos quanto de água doce, pois estes facilitam essa quantificação devido as suas formas bem definidas em função do hidrodinamismo. Diferenças morfológicas têm sido freqüentemente verificadas na diferenciação de grupos (REIS *et al.*, 1987; BARROS e ROSA, 1998; GARAVELLO, REIS e STRAUSS, 1991; BEMVENUTI, 2000; RIGA *et al.*, 2001; KASAM, SATO e YAMAOKA., 2002; SHIBATTA e HOFFMANN, 2005; SHIBATTA e ARTONI, 2005). Entretanto, pesquisas sobre variações morfológicas em peixes neotropicais ainda são muito escassas.

Uma das principais aplicações da morfometria multivariada é a análise das variáveis canônicas, a qual pertence à família das técnicas de discriminação multidimensional, que inclui ainda a análise das funções discriminantes e a análise de variância multivariada. O objetivo da análise de variáveis canônicas é reduzir a dimensão de uma matriz de caracteres obtidos de indivíduos pertencentes a diferentes grupos definidos *a priori* (GARAVELLO e REIS, 1988). O emprego da análise multivariada por si só não elimina resíduos de tamanho em relação à forma dentro de cada grupo. Para eliminação do tamanho dos componentes de forma (Análise dos Componentes Principais) foram criadas análises discriminantes independentes de tamanho (REIS; PESSÔA; STRAUSS, 1990).

2 OBJETIVOS

Astyanax altiparanae é uma espécie de peixe de pequeno porte recentemente revisada em sua taxonomia e nominalmente citada para a bacia do alto rio Paraná (GARUTTI e BRITSKI, 2000). Com vistas a interpretar a diversidade cariotípica em diferentes populações alopátricas de *Astyanax altiparanae* do alto rio Tibagi e do alto rio Iguaçu foram objetivos do presente estudo:

- Caracterizar por meio da técnica de coloração convencional Giemsa, o cariótipo de *Astyanax altiparanae* provenientes das duas localidades acima citadas;
- Caracterizar e analisar a microestrutura cariotípica através da utilização das técnicas de bandamento C, Ag-RONs, Fluorocromo base específico e hibridação *in situ*;
- Interpretar a variabilidade cariotípica, caso haja, frente à biogeografia histórica da região do divisor de águas das cabeceiras dos rios Tibagi e Iguaçu sob a óptica filogenética;
- Avaliar a ocorrência de diferenças morfológicas diagnósticas nas populações das diferentes localidades citadas acima.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL E LOCAIS DE COLETAS

Neste trabalho, foram realizados estudos citogenéticos e morfológicos comparativos entre populações pertencentes à espécie *Astyanax altiparanae* (Figura 1), conhecida como lambari-de-rabo-amarelo ou lambari relógio, pertencente à família Characidae, provenientes das bacias hidrográficas do alto rio Tibagi e alto rio Iguaçu no estado do Paraná, Brasil.

A população proveniente do alto rio Tibagi foi coletada no Parque Estadual de Vila Velha – Lagoa Tarumã (Ponta Grossa, Paraná, Brasil) e a população proveniente do alto rio Iguaçu foi coleta na Fazenda Experimental do Canguiri (Curitiba, Paraná, Brasil) (Figuras 2, 3).

Foram amostrados 133 exemplares de *Astyanax altiparanae* do alto rio Tibagi (65 exemplares) e do alto rio Iguaçu (66 exemplares), para as análises cariotípicas (60 exemplares) e morfológicas (73 exemplares). Exemplares testemunhos foram depositados no Museu de História Natural Capão da Imbuia, em Curitiba e identificados pelo Dr. Vinícius Abilhoa.

FIGURA 1 – EXEMPLAR DE *Astyanax altiparanae*. A BARRA REPRESENTA 3cm.

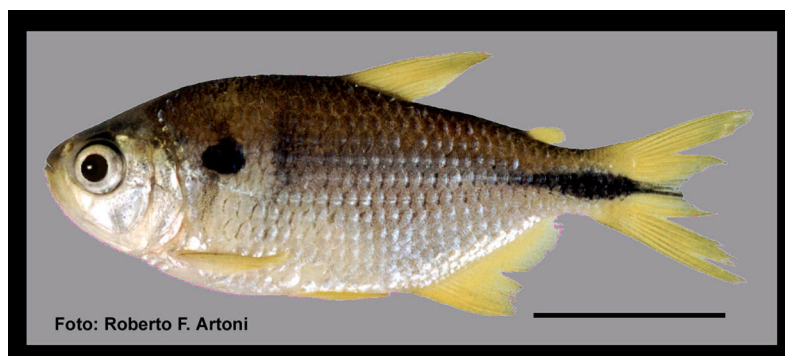


FIGURA 2 – MAPA DO ESTADO DO PARANÁ COM DESTAQUE PARA OS LOCAIS DE COLETA NOS RIOS TIBAGI (■) E IGUAÇU (▲).

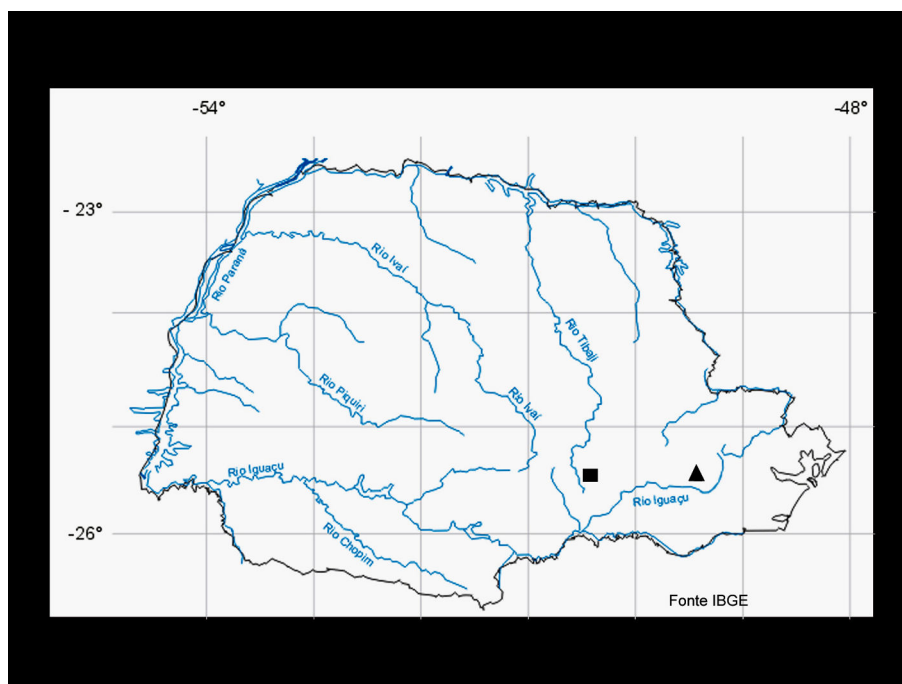
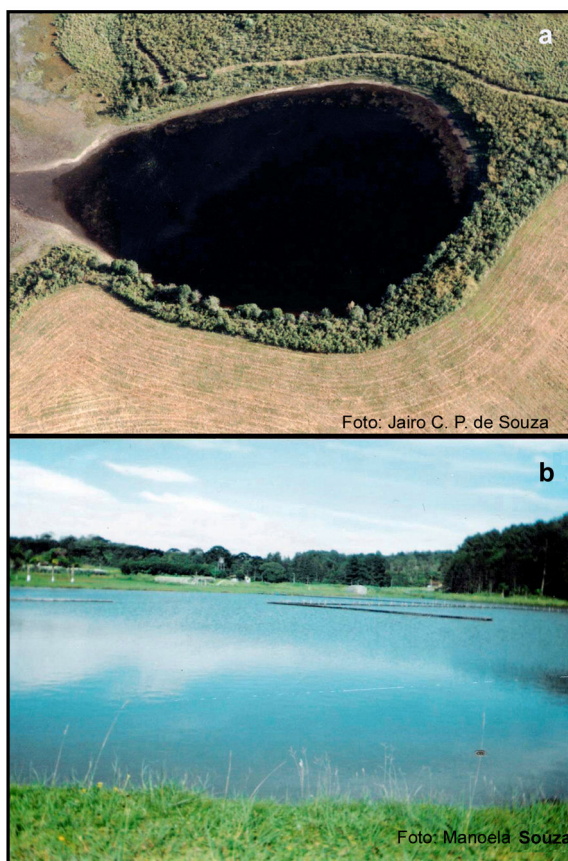


FIGURA 3 – ASPECTO DA LAGOA TARUMÃ DO PARQUE ESTADUAL DE VILA VELHA NA BACIA DO ALTO RIO TIBAGI (a) E DO LOCAL DE COLETA NA FAZENDA EXPERIMENTAL DO CANGUIRI NA BACIA DO ALTO RIO IGUAÇU (b).



3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção de metáfases mitóticas

Para obtenção de um maior número de células mitóticas foi utilizada a técnica que consiste em injetar previamente nos animais uma solução de fermento biológico segundo LEE e ELDER (1980), na musculatura próxima à nadadeira dorsal.

As preparações para obtenção dos cromossomos mitóticos foram obtidas com a porção anterior do rim, através da utilização do método de preparação direta segundo BERTOLLO; TAKAHASHI e MOREIRA-FILHO (1978) e da cultura de curto tempo de tecido segundo FENOCCHIO *et al.*, (1991), ambas com algumas modificações.

3.2.1.1 Obtenção de metáfases mitóticas – método direto “*in vivo*”, segundo BERTOLLO; TAKAHASHI e MOREIRA-FILHO (1978).

- a) injetar na região intra-abdominal, entre as nadadeiras peitorais e ventrais, solução aquosa de colchicina (0,025%), na proporção de 1ml/100g de peso do animal;
- b) deixar o peixe em aquário bem aerado por um período de 40 minutos. Decorrido este tempo, sacrificar o animal e retirar o órgão desejado: rim cefálico e/ou posterior;
- c) colocar o material em 10ml de solução hipotônica de KCl (0,075M) previamente aquecida a 37°C;

- d) fragmentar bem o material com auxílio de pinças de dissecação, completando-se esse processo, aspergindo e expirando o material, com seringa hipodérmica, desprovida de agulha, até que fique bem homogêneo;
- e) transferir o material obtido com o auxílio de uma pipeta Pasteur, para um tubo de centrífuga. Deixá-lo em estufa ou banho-maria a 37°C por 20 minutos (pedaços de tecidos ainda não desfeitos são descartados);
- f) acrescentar por volta de 1ml de fixador Carnoy I recém preparado (álcool metílico 3: ácido acético 1), ressuspender o material até que fique bem homogêneo, e deixá-lo em temperatura ambiente por 5 minutos;
- g) ressuspender o material e centrifugar durante 10 minutos, a 800-1000rpm. Descartar o sobrenadante com uma pipeta Pasteur;
- h) adicionar 6-8ml de fixador. Ressuspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur e centrifugar por 10 minutos a 800-1000rpm. Descartar o sobrenadante;
- i) repetir o processo anterior;
- j) após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, adicionar uma quantidade de fixador suficiente para se obter uma suspensão celular que não seja muito diluída e nem muito concentrada (cerca de 1ml de fixador para 0,5ml de sedimento). Ressuspender o material com cuidado até ficar homogêneo;
- k) colocar uma lâmina limpa sobre um suporte em banho-maria a 60° C. Pingar 300µl de suspensão com o auxílio de uma pipeta Pasteur sobre a lâmina pré-aquecida;
- l) secar o material ao ar;

m) o material deve ser guardado em tubos de microcentrífuga, devidamente tampado, em freezer a -20°C , para posterior utilização, caso a primeira lâmina não seja adequada para a análise;

n) após a secagem, corar a lâmina com Giemsa, diluído a 5% em tampão fosfato pH 6.8, durante 10 minutos. Lavar em água corrente e secar ao ar.

3.2.1.2 Obtenção de metáfases mitóticas – método indireto “*in vitro*”, segundo FENOCCHIO *et al.*, (1991).

a) retirar aproximadamente 3mm^3 da porção anterior do rim e colocar em uma placa de Petri contendo 5ml de meio de cultura RPMI suplementado com 20% de soro bovino fetal e antibiótico;

b) desagregar o material com pinça de ponta fina com posterior aspersão e expiração da solução com uma seringa de vidro sem agulha;

c) incubar a solução de células em estufa a 29°C por 7 horas em média;

d) pingar $300\mu\text{l}$ de colchicina (0,025%) em cada recipiente 25 minutos antes de completar o tempo. Agitar suavemente a placa de Petri para homogeneizar o material e manter em estufa até o término do tempo;

e) transferir a cultura para um tubo de ensaio e centrifugar por 10 minutos a 800-900rpm;

f) descartar o sobrenadante e completar o tubo de ensaio até 8ml com solução hipotônica de KCL (0,075M). Ressuspender a solução e incubar por cerca de 30 minutos a uma temperatura de 37°C ;

- g) preparar solução fixadora Carnoy I com três partes de metanol para uma parte de ácido acético e manter sob refrigeração. Após o tempo da hipotonização, adicionar cerca de 1ml do fixador em cada tubo. Ressuspender o material até ficar homogêneo, e centrifugar por 10 minutos a 800-900rpm;
- h) descartar o sobrenadante e em seguida completar o tubo até o volume de 8ml;
- i) ressuspender o material novamente e centrifugar por 10 minutos a 800-900rpm;
- j) repetir a etapa anterior por duas vezes;
- k) descartado o sobrenadante, colocar fixador e ressuspender o material. Armazenar esta solução em tubo de microcentrifuga em freezer à -20°C ou gotear o material sobre lâminas de vidro previamente limpas e secar ao ar.

3.2.2 Método de coloração convencional - Giemsa

Para analisar o número e morfologia dos cromossomos, as lâminas preparadas com a suspensão celular para a obtenção de cromossomos mitóticos foram coradas com solução de Giemsa, diluído em tampão fosfato pH 6.8 a 5% durante aproximadamente 10 minutos e em seguida lavadas em água corrente e secas ao ar.

3.2.3 Estudos Cariotípicos

As preparações foram analisadas em microscópio binocular de campo claro. As metáfases mitóticas que apresentaram melhor dispersão, condensação e morfologia cromossômica, foram analisadas em microscópio Olympus BX41 com captura de imagem através de câmera digital Olympus 5.1.

3.2.4 Identificação cromossômica

A identificação cromossômica foi realizada baseada nos critérios da relação de braços (RB), proposta por LEVAN, FREDGA e SANDBERG (1964), e classificados como metacêntricos (m) (RB= 1,00 a 1,70); submetacêntricos (sm) (RB= 1,71 a 3,00); subtelocêntricos (st) (RB= 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (a) (RB>7,00).

3.2.5 Coloração das regiões organizadoras de nucléolos Ag-RONs

O procedimento foi executado conforme a técnica descrita por HOWELL e BLACK (1980), com algumas modificações.

- a) gotear o material sobre lâminas de vidro previamente limpas e secar ao ar;
- b) pingar ($\pm 150\mu\text{l}$) da solução coloidal reveladora (1g de gelatina dissolvida em 50 ml de água destilada acrescida de 0,5 ml de ácido fórmico) e duas gotas ($\pm 300\mu\text{l}$) da solução de nitrato de prata 50% (1g de AgNO_3 dissolvida em 2 ml de água destilada) sobre o material na lâmina;
- c) cobrir com lamínula;
- d) levar a lâmina à estufa a 60°C até que a mistura das soluções alcance uma coloração marrom-dourada;
- e) lavar a lâmina em água corrente e deixar secar ao ar;
- f) se necessário, corar com Giemsa a 1% em tampão fosfato pH 6.8 por 30 segundos.

3.2.6 Detecção da heterocromatina - Bandas CBG

A técnica utilizada foi a descrita por SUMNER (1972), com algumas modificações.

- a) colocar a lâmina recentemente preparada para a obtenção de cromossomos mitóticos em solução de HCL 0,2N, a 42°C, por 5 minutos;
- b) lavar a lâmina com água destilada e deixar secar ao ar;
- c) colocar a lâmina em solução de hidróxido de bário a 5% ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) à 28° C por aproximadamente 20 segundos;
- d) imergir a lâmina rapidamente em ácido HCL 0,2N e lavar com jatos de água;
- e) colocar a lâmina em uma solução de 2xSSC (15,53g de NaCl + 8,82g de Citrato Trissódico + Água deionizada) por uma hora à 60° C;
- f) lavar a lâmina em água destilada e secar ao ar;
- g) corar o material com Giemsa a 2% em tampão fosfato pH 6.8 durante 30 minutos.

3.2.7 Coloração pelo fluorocromo cromomicina A₃ (GC específico) contra-corado com o fluorocromo DAPI (AT específico).

- a) A técnica utilizada foi a descrita por SCHWEIZER (1980), como segue:
- b) pingar 300µl da solução celular em uma lâmina limpa e secar ao ar;

- c) colocar 150µl da solução de DAPI 0,1mg/ml sobre o material, cobrir com lamínula e deixar agindo por 15 minutos. Escorrer a lamínula e lavar em água corrente, deixando secar por poucos minutos;
- d) adicionar 150µl de solução de cromomicina A₃ (1 mg/ml), cobrir com lamínula e deixar por 60 minutos no escuro;
- e) escorrer a lamínula e lavar em água de torneira;
- f) deixar secar ao ar e montar com uma nova lamínula utilizando meio de solução de sacarose saturada, filtrada antes do uso ou em meio de montagem;
- g) manter a lâmina no escuro e examinar sob microscopia de epifluorescência após cerca de 30 dias.

3.2.8 Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de DNAr 18S e 5S

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi empregada para localizar as regiões de rDNA nos cromossomos. Foi utilizada uma sonda de rDNA 18S (cerca de 1.800 pb), obtida por PCR a partir do DNA nuclear do peixe *Prochilodus hilarii* (HATANAKA, 2000), usando os *primers* NS1 5'- GTAGTCATATGCTTGTCTC-3' e NS8 5'- TCCGCAGGTTACCTACGGA – 3', segundo WHITE *et al.* (1990) e, uma sonda de rDNA 5S obtida a partir da espécie *Leporinus obtusidens* (MARTINS e GALETTI Jr., 1999), usando os *primers* A 5'- TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3' e B 5'- CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3'.

I - Marcação da sonda por *nick translation*

Para marcação da sonda, foi utilizado o kit *Nick Translation* da Invitrogen®.

- a) pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5ml no gelo;
- b) 28,3µl de água qsp para a sonda rDNA 18S e 23,6µl de água qsp para a sonda rDNA 5S;
- c) 7,5µl de dNTP Mix 10x com dATP mais biotina;
- d) 2,7µl de DNA 18S e 6,4 µl de DNA 5S;
- e) 7,5 de enzima mix 10x (DNAse + DNA polimerase I);
- f) o volume final da reação deve ser 45µl para cada sonda e o volume de água a ser colocado depende da concentração da sonda;
- g) misturar, centrifugar brevemente (cerca de 5segundos) e incubar a 16°C durante 2 horas;
- h) colocar o tubo no gelo e checar em gel o tamanho dos fragmentos (deve ser menor que 500pb);
- i) adicionar 7,5µl de *stop buffer*;
- j) precipitar o DNA com 5µl de acetato de sódio 3M e 100µl de etanol PA;
- k) incubar a -20° C *overnight*;
- l) centrifugar a 14.000rpm por 10 minutos;
- m) descartar o sobrenadante e lavar o *pellet* com 50µl etanol 70%;
- n) centrifugar a 14.000rpm por 5minutos;
- o) descartar o sobrenadante, secar em estufa a 37°C e diluir em 2µl de água;

II – Tamanho dos fragmentos em gel

- a) misturar 1µl da reação de *nick translation* com;
- b) 1µl de azul de bromofenol;
- c) aplicar em gel de agarose 0,8% mais brometo de etídio (1µl);
- d) correr a amostra por 20 a 30 minutos e checar o tamanho dos fragmentos;

III – Hibridação fluorescente *in situ*

- a) lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 minutos a temperatura ambiente;
- b) desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 minutos cada e após secar;
- c) incubar as lâminas em 90µl de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37°C por 1 hora em câmara úmida com água milli-Q;
- d) lavar três vezes por 5 minutos em 2xSSC;
- e) lavar durante 5 minutos em PBS 1 vez;
- f) fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl₂ durante 10 minutos a temperatura ambiente;
- g) lavar em PBS 1x por 5 minutos (*shaker*);
- h) desidratar as lâminas em série alcoólica (70, 85, 100%) por 5 minutos cada;

- i) desnaturar a solução de hibridação a 100°C por um período de 10 minutos simultaneamente a desidratação em série alcoólica e passá-la imediatamente ao gelo;
- j) desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 minutos;
- k) desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 minutos cada;
- l) preparar a câmara úmida a 37°C;
- m) montar cada lâmina com 50µl da solução de hibridação, cobrir com lamínula e deixar *overnight* a 37°C;

IV - Lavagens

- a) lavar duas vezes em formamida 15%/0,2xSSC pH 7.0 a 42°C durante 10 minutos cada ;
- b) lavar as lâminas três vezes em 0,1xSSC a 60°C, por 5 minutos cada (*shaker*);
- c) lavar durante 5 minutos em solução de Tween 0,5%/4xSSC, a temperatura ambiente (*shaker*);
- d) incubar as lâminas em tampão 5% NFDM/4xSSC por 15 minutos;
- e) lavar 2vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/ 4xSSC, a temperatura ambiente (*shaker*);
- f) incubar as lâminas com 90µl de FITC (0,8µl FITC/800µl NFDM) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;

- g) lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, a temperatura ambiente (*shaker*);
- h) incubar com 90µl de anti-avidina (8µl anti-avidina/792µl de NFDm) durante 30 min em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- i) lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, a temperatura ambiente (*shaker*);
- j) incubar as lâminas com 90µl de FITC (0,8µl FITC/800µl NFDm) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- k) lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, a temperatura ambiente (*shaker*);
- l) incubar com 90µl de anti-avidina (8µl anti-avidina/792µl de NFDm) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- m) lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, a temperatura ambiente (*shaker*);
- n) incubar as lâminas com 90µl de FITC (0,8µl FITC/800µl NFDm) durante 30 minutos em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente;
- o) lavar três vezes por 5 minutos com Tween 0,5%/4xSSC, a temperatura ambiente (*shaker*);
- p) desidratar em álcool 70, 85 e 100%, 5 minutos cada (secar);

V – Montagem da lâmina

- a) misturar 200µl de *antifading* com 8µl de iodeto de propídio (50µg/ml);
- b) colocar 25µl da mistura e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.

3.2.9 Parâmetros Morfométricos

Caracteres morfométricos foram obtidos de 73 exemplares do lambari *Astyanax altiparanae*, capturados no alto rio Tibagi e alto rio Iguaçu, com a finalidade de promover uma avaliação morfológica dessas populações através da análise discriminante independente de tamanho.

Foram analisados 36 espécimens do alto rio Tibagi e 37 espécimens do alto rio Iguaçu. As medidas dos caracteres foram obtidas com o auxílio de paquímetro de aço, com precisão de 0.05mm. Através da associação de 14 marcos anatômicos definidos a partir da metodologia proposta por STRAUSS e BOOKSTEIN (1982), para cada exemplar, foram tomadas 17 medidas morfométricas (Figura 4).

As variáveis morfométricas utilizadas foram comprimento padrão, comprimento pré-dorsal, comprimento pré-ventral, comprimento pré-peitoral, comprimento pré-anal, altura do corpo, altura do pedúnculo caudal, comprimento do pedúnculo caudal, comprimento da nadadeira dorsal, comprimento da nadadeira ventral, comprimento da nadadeira peitoral, comprimento da nadadeira anal, comprimento da cabeça, comprimento do focinho, comprimento da maxila, limite interorbital e diâmetro da órbita. A definição de cada caráter e a abreviatura utilizada em cada caso é a seguinte:

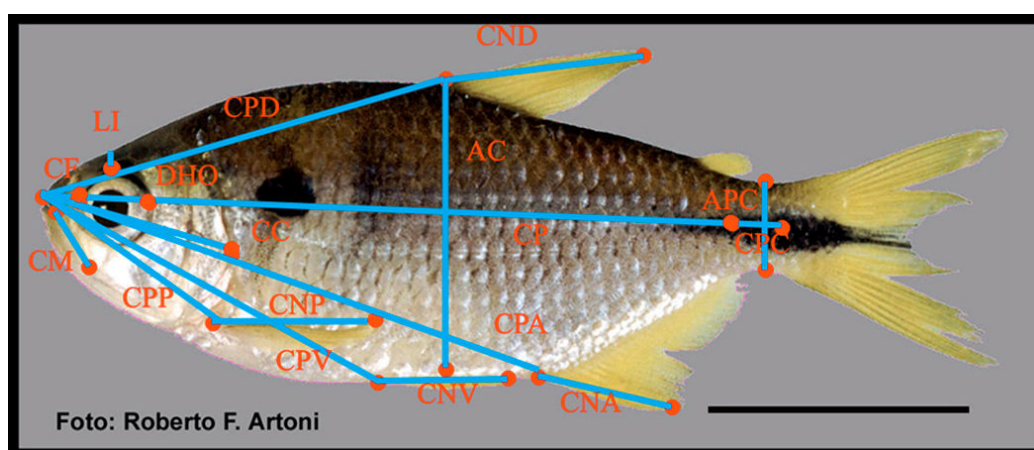
- a) COMPRIMENTO PADRÃO (CP): distância entre a parte mais anterior do focinho e a origem dos raios medianos da nadadeira caudal
- b) COMPRIMENTO PRÉ-DORSAL (CPD): distância entre o extremo anterior do focinho e a origem da nadadeira dorsal
- c) COMPRIMENTO PRÉ-VENTRAL (CPV): distância entre o extremo anterior do focinho e a origem da nadadeira ventral
- d) COMPRIMENTO PRÉ-PEITORAL (CPP): distância entre o extremo anterior do focinho e a origem da nadadeira peitoral
- e) COMPRIMENTO PRÉ-ANAL (CPA): distância entre o extremo anterior do focinho e a origem da nadadeira anal

- f) ALTURA DO CORPO (AC): maior distância vertical entre as superfícies dorsal e ventral do corpo
- g) ALTURA DO PEDÚNCULO CAUDAL (APC): menor distância vertical entre as superfícies dorsal e ventral do pedúnculo caudal
- h) COMPRIMENTO PEDÚNCULO CAUDAL (CPC): distância entre a origem do extremo distal da nadadeira anal e a origem dos raios medianos da nadadeira caudal
- i) COMPRIMENTO DA NADADEIRA DORSAL (CND): distância entre a origem da nadadeira e o extremo de seu maior raio
- j) COMPRIMENTO DA NADADEIRA VENTRAL (CNV): distância entre a origem da nadadeira e o extremo distal de seu maior raio
- k) COMPRIMENTO DA NADADEIRA PEITORAL (CNP): distância entre a origem da nadadeira e o extremo distal de seu maior raio
- l) COMPRIMENTO DA NADADEIRA ANAL (CNA): distância entre a origem da nadadeira e o extremo distal de seu maior raio
- m) COMPRIMENTO DA CABEÇA (CC): distância entre a parte mais anterior do focinho e a parte óssea mais posterior do opérculo (não inclui sua porção membranosa)
- n) COMPRIMENTO DO FOCINHO (CF): distância entre a parte mais anterior do focinho e a margem óssea anterior da órbita
- o) COMPRIMENTO DA MAXILA (CM): distância entre a parte mais anterior da articulação do maxilar com o pré-maxilar e o extremo distal do osso
- p) LIMITE INTERORBITAL (LI): distância entre as órbitas, medida a partir do ponto mais dorsal de suas margens ósseas
- q) DIÂMETRO DA ÓRBITA (DHO): diâmetro horizontal interno da órbita óssea

Os 17 parâmetros morfométricos foram submetidos à Análise das Variáveis Canônicas Independente de Tamanho (AVC) através dos programas PAST 1.3

(HAMMER e HARPER, 2004) e BACWIN MORPHOMETRICS (DUJARDIN, 2002). Nesta análise foi estudada a variação entre as populações segundo GARAVELLO e REIS (1988), SCHAEFER (1991) e SHIBATTA e GARAVELLO (1993).

FIGURA 4 - CARACTERES MORFOMÉTRICOS EM *Astyanax altiparanae*



4 RESULTADOS

4.1 DADOS CARIOTÍPICOS

Os espécimes de *Astyanax altiparanae* analisados do alto rio Tibagi (30) e alto rio Iguaçu (30) apresentaram $2n=50$ cromossomos com o número fundamental igual a 92 e 94, respectivamente. O cariótipo é constituído por 3 pares de cromossomos metacêntricos, 14 pares de cromossomos submetacêntricos, 4 pares de cromossomos subtelocêntricos e 4 pares de cromossomos acrocêntricos na população do rio Tibagi, enquanto que a população do rio Iguaçu apresentou 3 pares de cromossomos metacêntricos, 15 pares de cromossomos submetacêntricos, 4 pares de cromossomos subtelocêntricos e 3 pares de cromossomos acrocêntricos, sem evidência de heteromorfismo de cromossomos sexuais (Figuras 5A e B, respectivamente).

O padrão de distribuição da heterocromatina no cariótipo verificado pelo bandamento C foi similar para as duas populações analisadas. Pequenos blocos banda C+ foram evidenciados. Vários cromossomos do complemento, especialmente cromossomos submetacêntricos e subtelocêntricos, mostraram blocos de heterocromatina intersticiais pontuais e eqüidistantes do centrômero, enquanto outras marcações pericentroméricas foram mais fortemente marcadas (Figuras 6c, d). A população do alto rio Tibagi apresenta ainda alguns cromossomos com o braço curto totalmente heterocromáticos (Figura 6d).

As regiões organizadoras de nucléolos (RONs) foram evidenciadas por marcações coincidentes com nitrato de prata (Ag-RONs) e marcações brilhantes positivas com o fluorocromo GC específico, cromomicina A₃ contra-corado com DAPI, mostrando um padrão simples na população do rio Iguaçu e múltiplo na população do rio Tibagi. Exceção deve ser feita a um par cromossômico na população do rio Iguaçu que apresentou regiões CMA₃ brilhantes que não foram marcadas pela prata. A população do rio Iguaçu possui as RONs localizadas na região telomérica do braço curto de um par de cromossomos subtelocêntricos, enquanto a população do rio

Tibagi apresentou marcações pela prata em um par de cromossomos comparável ao da população do Iguaçu e outros dois cromossomos não pareáveis com marcas um no braço curto e outro no braço longo (Figuras 6a, 6b e Figura 7a, 7b) Cinco outros cromossomos do cariótipo de *A. altiparanae* do rio Tibagi mostraram regiões GC brilhantes (Figura 7a).

A hibridação fluorescente *in situ* com sondas de rDNA 18S coincidiram com as heterocromatinas de natureza GC ricas evidenciadas pela Cromomicina A₃ invariavelmente em todas as metáfase analisadas para as duas populações. Somente um par de cromossomos portador de heterocromatina GC não foi coincidente com as marcações FISH 18S na população do rio Iguaçu. Um máximo de dois *locos* de DNA ribossomal maior foi verificado na população do rio Iguaçu enquanto a população do rio Tibagi apresentou até sete regiões cromossômicas portadoras de rDNA 18S (Figuras 6c, d). A hibridação fluorescente *in situ* com a sonda de rDNA 5S mostrou os sítios destes genes localizados na região pericentromérica de um par de cromossomos submetacêntricos nas duas populações amostradas (Figuras 7e, f).

4.2 DADOS MORFOMÉTRICOS

A análise das variáveis canônicas independentes de tamanho (AVC) das amostras populacionais de *Astyanax altiparanae* das duas localidades nas bacias do alto rio Tibagi (36) e alto rio Iguaçu (37), revelou uma sobreposição dos escores individuais das medidas morfométricas de ambas as populações analisadas no espaço definido pelos dois primeiros eixos canônicos. O gráfico (Figura 8) mostra que ocorreu sobreposição entre as duas populações estudadas. O primeiro eixo canônico (CA1) concentrou a maior parte da variância dos dados, sendo responsável por 45,79% da variação, enquanto que o segundo eixo (CA2) mostrou 11,67% da variação dos dados.

As variáveis discriminantes dos eixos 1 (CA 1) e 2 (CA 2) foram Comprimento do Pedúnculo Caudal (CPC), Comprimento da Maxila (CM), Comprimento do Focinho (CF) e Altura do Pedúnculo Caudal (APC). Os valores

médios de CPC ($t=4,47$; $p<0,05$) e CM ($t=2,19$; $p<0,05$) foram significativamente diferentes entre as populações analisadas, sendo os maiores valores registrados para a amostra do rio Iguaçu (Tabela 1).

FIGURA 5 - CARIÓTIPOS DE *Astyanax altiparanae* PROVENIENTES DO ALTO RIO TIBAGI (A) E ALTO RIO IGUAÇU (B).

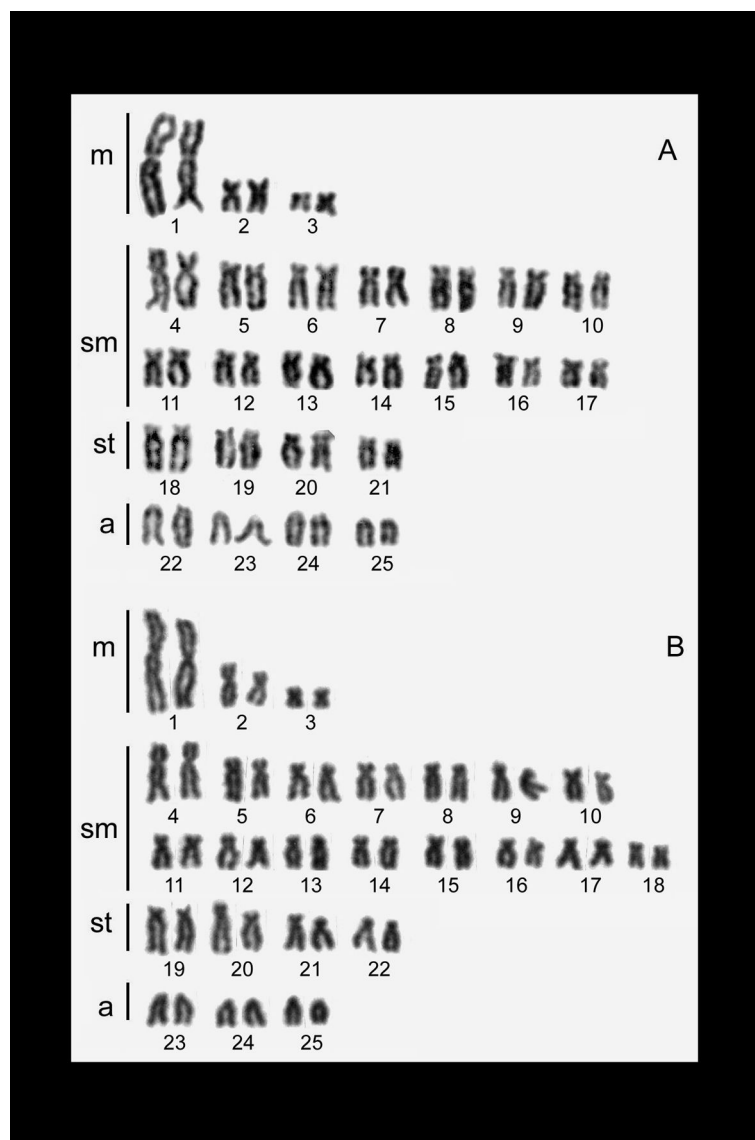


FIGURA 6 - METÁFASES MITÓTICAS DE *Astyanax altiparanae* DO ALTO RIO TIBAGI (a; c) E ALTO RIO IGUAÇU (b; d). REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLEÓLOS MARCADAS COM NITRATO DE PRATA (a; b); REGIÕES HETEROCROMÁTICAS EVIDENCIADAS PELO BANDAMENTO C (c; d).

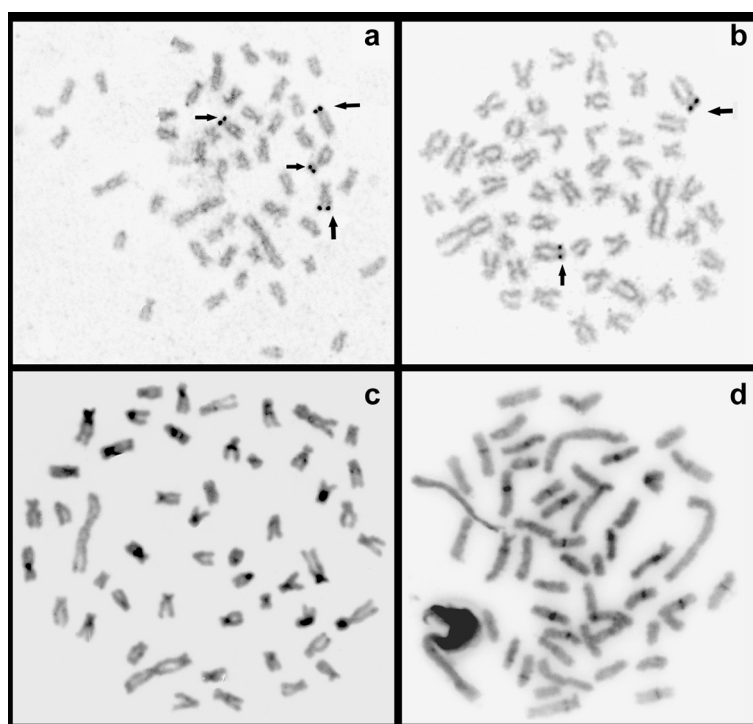


FIGURA 7 - METÁFASES MITÓTICAS DE *Astyanax altiparanae* DO ALTO RIO TIBAGI (a, c, e) E ALTO RIO IGUAÇU (b, d, f). REGIÕES HETEROCROMÁTICAS EVIDENCIADAS COM CROMOMICINA A₃/DAPI (a; b); HIBRIDAÇÃO *in situ*, REGIÃO 18S (c; d); HIBRIDAÇÃO *in situ*, REGIÃO 5S (e; f).

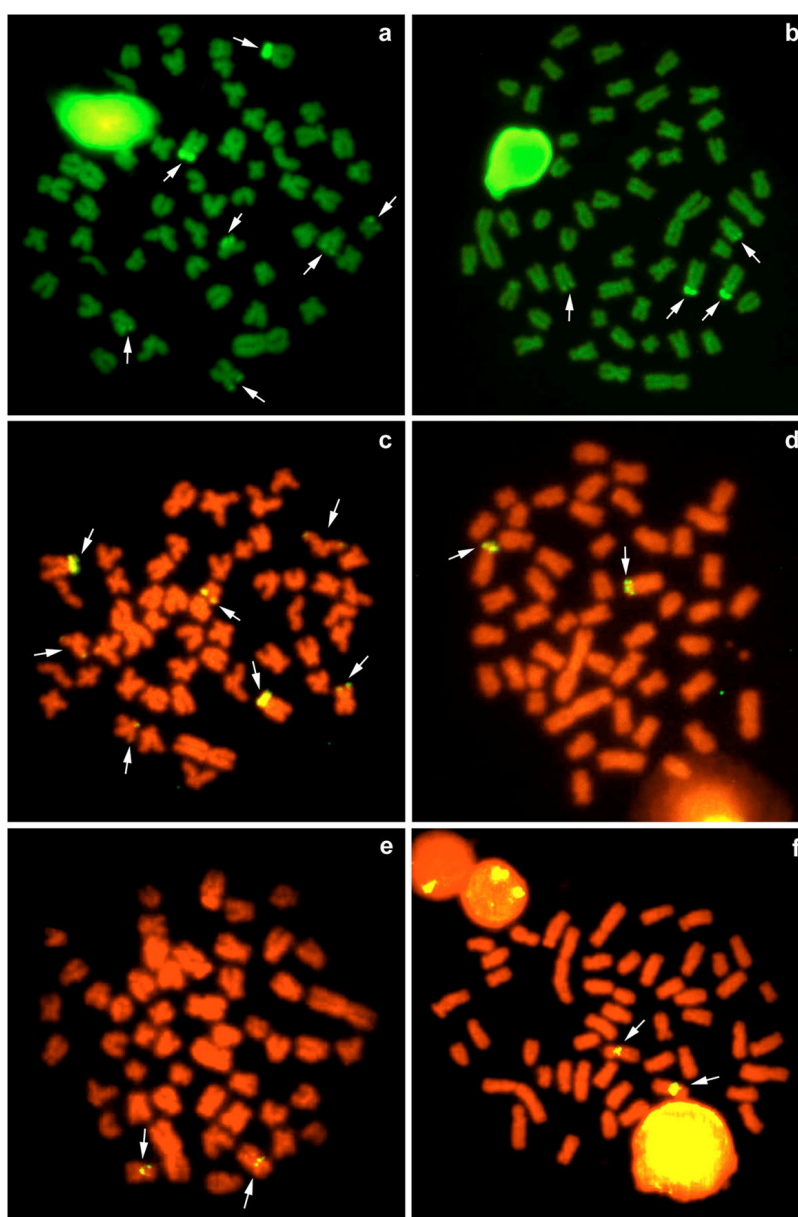


FIGURA 8 - PROJEÇÃO DOS ESCORES INDIVIDUAIS NOS DOIS PRIMEIROS EIXOS DA ANÁLISE DAS VARIÁVEIS CANÔNICAS LIVRES DO TAMANHO, DAS AMOSTRAS COMBINADAS DE *Astyanax altiparanae* 36 ESPÉCIMES DO ALTO RIO TIBAGI (2) E 37 ESPÉCIMES DO ALTO RIO IGUAÇU (1).

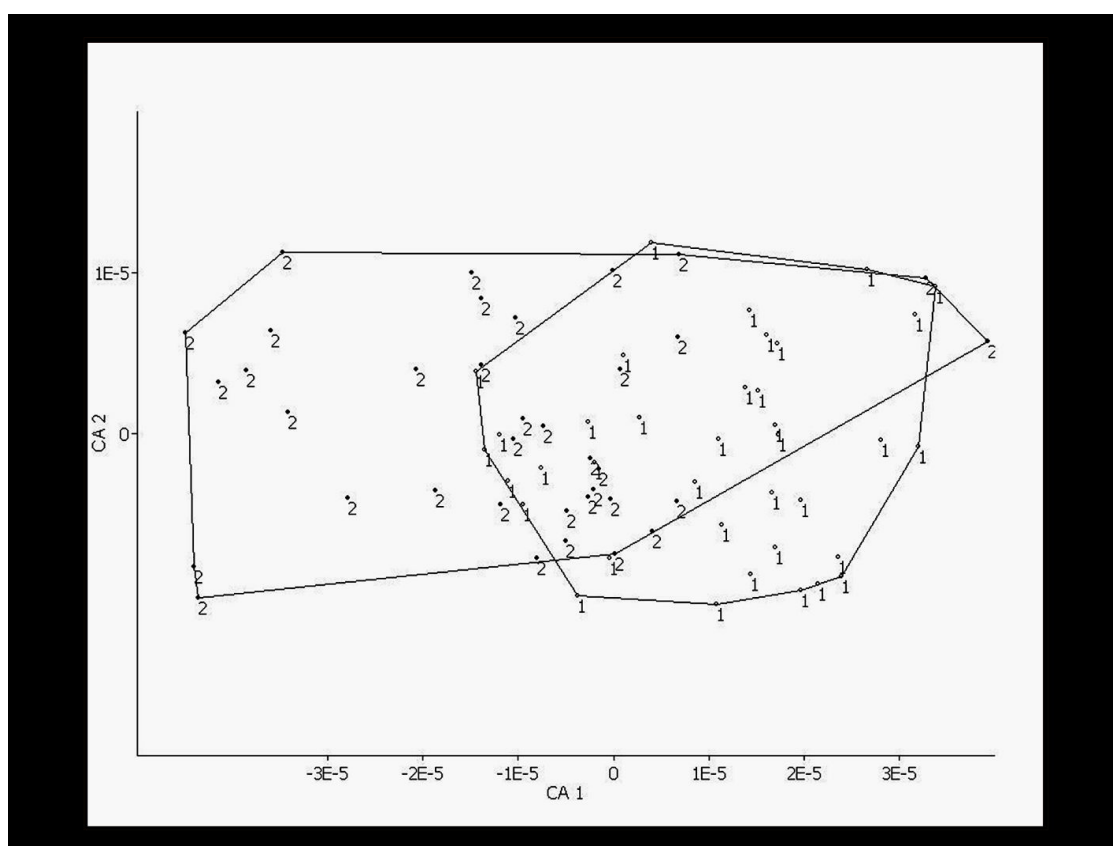


TABELA 1 – ESCORES DAS VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS NOS EIXOS CANÔNICOS DAS AMOSTRAS DE *Astyanax altiparanae* DO ALTO RIO TIBAGI E ALTO RIO IGUAÇU.

Variáveis	CA 1	CA 2
CP	0,460	-0,413
CPD	0,586	-0,274
CPV	0,529	-0,267
CPP	0,450	-0,113
CPA	0,615	-0,307
AC	0,647	-0,028
APC	-0,324	1,211
CPC	-4,643	-2,307
CND	0,252	-0,252
CNV	-0,035	-0,018
CNP	0,012	0,397
CNA	0,420	-0,795
CC	0,270	-0,196
CF	-1,004	2,849
CM	-1,329	3,206
DHO	-0,389	-0,219
LI	-0,576	0,708

Nota: CA 1 = primeiro eixo canônico, CA 2 = segundo eixo canônico, CP = comprimento padrão, CPD = comprimento pré-dorsal, CPV = comprimento pré-ventral, CPP = comprimento pré-peitoral, CPA = comprimento pré-anal, AC = altura do corpo, APC = altura do pedúnculo caudal, CPC = comprimento do pedúnculo caudal, CND = comprimento da nadadeira dorsal, CNV = comprimento da nadadeira ventral, CNP = comprimento da nadadeira peitoral, CNA = comprimento da nadadeira anal, CC = comprimento da cabeça, CF = comprimento do focinho, CM comprimento da maxila, DHO = diâmetro da órbita, LI = limite interorbital.

5 DISCUSSÃO

5.1 COMPARAÇÕES CARIOTÍPICAS NO GÊNERO *Astyanax* COM ÊNFASE EM *Astyanax altiparanae*

Os dados cariotípicos aqui obtidos para as duas populações estudadas de *Astyanax altiparanae*, indicam um conservadorismo do número cromossômico diplóide. Indistintamente de todos os estudos citogenéticos conduzidos em *Astyanax altiparanae* (algumas vezes citados como *Astyanax bimaculatus*) até o presente (FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004), verificou-se também para as duas populações aqui amostradas um número cromossômico diplóide igual a 50 cromossomos. Este é, portanto um caráter que deve ser considerado como basal para a espécie e de grande relevância para a polarização de dados cariotípicos em comparações filogenéticas no gênero *Astyanax*. Em relação a diferenciação sexual não foi verificado heteromorfismo cromossômico em nenhuma das populações estudadas ao nível das análises realizadas. Por outro lado, as fórmulas cariotípicas e o número fundamental de ambas as populações indicam a quebra de um maior conservadorismo evolutivo. Alterações cariotípicas interpopulacionais atribuídas a diferenças de tipos cromossômicos, especialmente em relação aos cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos podem ser observadas nas populações do alto rio Tibagi e alto rio Iguaçu, refletindo uma diferenciação para o número fundamental estabelecido como NF=92 e 94, respectivamente. Eventos de diversificação cariotípica do tipo não robertsonianos, a exemplo das inversões, especialmente as inversões pericêntricas, devem ganhar destaque na evolução cariotípica desta espécie.

TAKAHASHI (1995), estudando espécimes de *A. altiparanae* do ribeirão Três Bocas, observou a ocorrência de três citótipos diferentes (citótipo A: 12m+28sm+2st+8a e NF=92, citótipo B: 6m+22sm+16st+6a e NF=94, citótipo C:

18m+16sm+8st+4a e NF=88). Uma vez que os números fundamentais não são constantes entre os diferentes citótipos os autores propõem a ocorrência de um polimorfismo cromossômico devido a rearranjos do tipo inversão pericêntrica.

Outros estudos têm demonstrado variação interpopulacional da macroestrutura cariotípica em *Astyanax altiparanae* a exemplo de PACHECO (2001), PACHECO, GIULIANO-CAETANO e DIAS (2001), PORTO e MARTINS-SANTOS (2002), FERNANDES e MARTINS-SANTOS (2004) e MORELLI *et al.* (1983) e PAGANELLI (1990) onde a espécie é citada como *Astyanax bimaculatus*. Este nível de variabilidade cariotípica pode ser explicado em parte recorrendo à biologia da espécie. *Astyanax altiparanae* apresenta grande capacidade adaptativa exploratória, utilizando estratégias diferenciadas na estrutura da população (ORSI; SHIBATA e SILVA-SOUZA, 2002). Portanto, a elevada plasticidade alimentar de *Astyanax altiparanae*, bem como sua capacidade de reproduzir em vários ambientes, sugerem o sucesso desta espécie no processo de colonização de novos habitats. Entretanto, observa-se uma preferência pela permanência em águas mais lânticas. Reflexo desta situação é que esta espécie ocorre numa grande diversidade de microambientes e suas populações não são homogêneas quanto à morfologia (GARUTTI e BRITSKI, 2000).

As condições acima apresentadas favorecem a fixação de variações regionais, a exemplo do que ocorre com a fórmula cariotípica e com o número fundamental de diferentes populações de *Astyanax altiparanae* já caracterizadas sob estes aspectos nas bacias do rio Tibagi e rio Iguaçu (Figura 9). Contudo, do ponto de vista citotaxonômico, destaca-se que o epíteto específico deva ser mantido para os exemplares aqui analisados haja vista a falta de caracteres consistentes para a proposição de uma nova espécie.

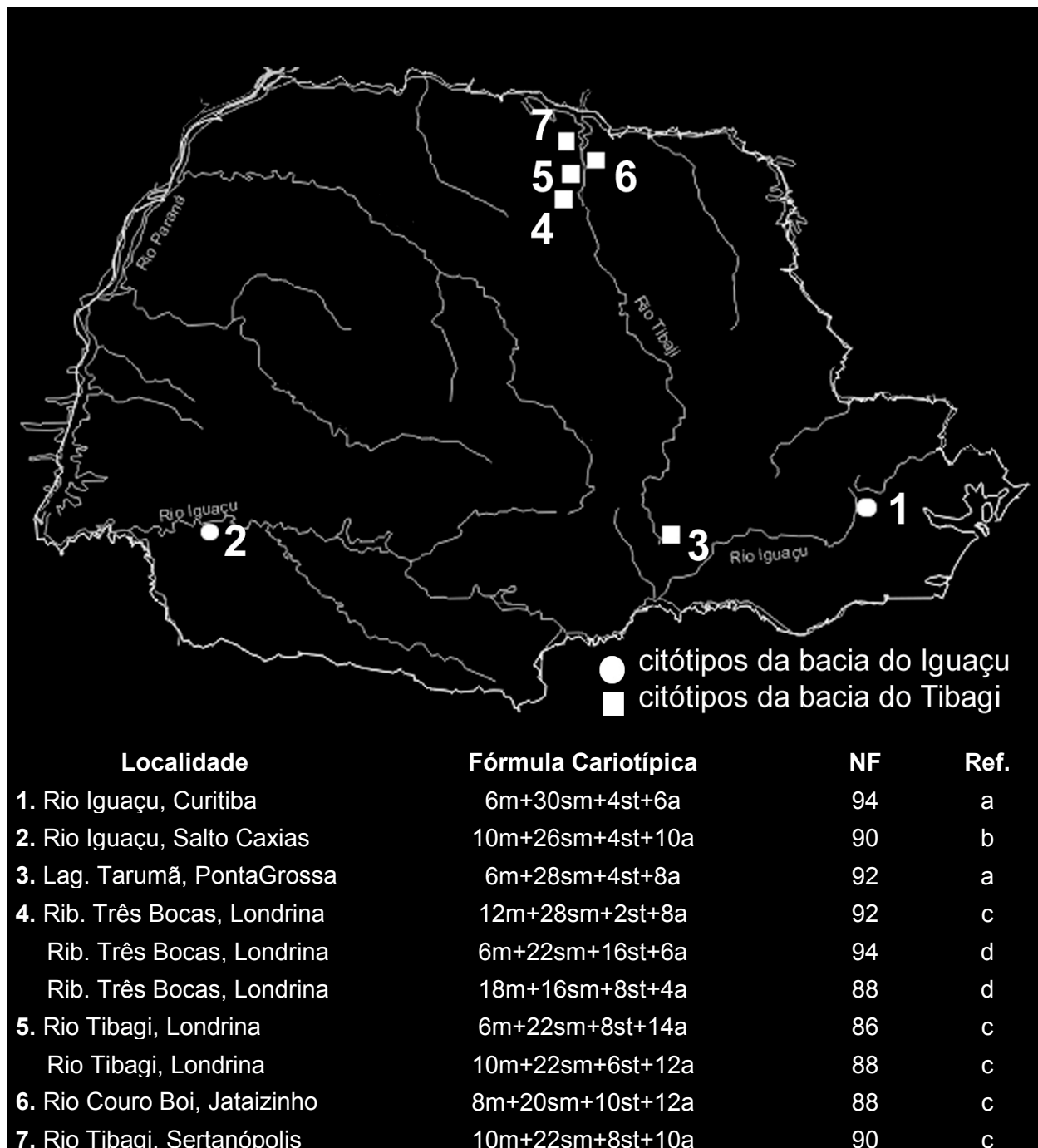
A hipótese de fluxo gênico ou evento recente de isolamento reprodutivo, proposta por PRIOLI *et al.* (2002) para populações de *A. altiparanae* do médio e baixo rio Iguaçu em relação a uma população externa pertencente ao rio Paraná não descarta a possibilidade de que introduções antrópicas, eventos de captura de cabeceiras ou de introgressão gênica possam ocorrer na bacia do rio Iguaçu em acréscimo a diversidade esperada por vicariância e/ou dispersão.

A bem dos efeitos de vicariância sobre a evolução cariotípica de espécies que ocupam grandes bacias hidrográficas distintas a exemplo do rio Tibagi e Iguaçu, o quadro que se apresenta para *Astyanax altiparanae* em sua distribuição ao longo destas bacias individualmente, indica o estabelecimento de uma acentuada irradiação adaptativa por dispersão. Diferentes citótipos podem ser identificados ao longo destas bacias, marcadamente em relação a suas fórmulas cariotípicas e número fundamental (NF). Eventualmente as hipóteses de vicariância e dispersão poderão ser testadas por cladística ou métodos semelhantes empregando marcadores moleculares em complemento àqueles aqui utilizados.

Apesar das diferenças verificadas na macroestrutura cariotípica interpopulacional a hipótese de estabilidade do número cromossômico diplóide em *A. altiparanae*, com $2n = 50$ cromossomos, levantada por PAGANELLI (1990) é corroborada no presente estudo. Esta tendência pode ser consequência do comportamento migrador de *A. altiparanae* que, mesmo sendo a curta distância (ORSI *et al.*, 2002), pode ser um fator de homogeneização do número diplóide desta espécie amplamente distribuída pela bacia do Alto Paraná (GARUTTI e BRITSKI, 2000).

Em relação a processos de microevolução o comportamento cariotípico não se cerca simplesmente de fatores extrínsecos de comportamento populacional para explicar tendências evolutivas como a localização e distribuição de seqüências de DNA altamente repetitivas como as heterocromatinas e das seqüências moderadamente repetitivas como as regiões organizadoras do nucléolo.

FIGURA 9 – CITÓTIPOS DE *Astyanax altiparanae* ENCONTRADOS NA BACIA DOS RIOS TIBAGI E IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL.



Fontes: (a) Presente estudo, (b) PORTO e MARTINS-SANTOS (2002), (c) PACHECO (2001), (d) TAKAHASHI (1995).

O padrão de distribuição da heterocromatina, verificado nas duas populações de *A. altiparanae* aqui analisadas pelo bandamento C e pelo fluorocromo GC específico cromomicina A₃, indicou características distintas daquelas verificadas para outros *Astyanax* como *A. scabripinnis* e *A. fasciatus* que apresentam blocos conspícuos, especialmente em cromossomos acrocêntricos, e natureza variada para diferentes classes de heterocromatina. No presente estudo a distribuição da heterocromatina ocorre principalmente em cromossomos de dois braços em regiões pericentroméricas e algumas vezes em marcas menos evidentes intersticialmente localizadas no braço longo destes cromossomos. A natureza destas heterocromatinas não foi diferenciada pelo fluorocromo empregado, a exceção das heterocromatinas associadas às regiões organizadoras de nucléolos que se apresentaram ricas em bases GC. Particularmente, um par marcado com CMA₃ na população do rio Iguaçu não foi coincidente com marcações Ag-RON ou hibridada com sondas de rDNA.

Este padrão de localização pericentromérica e intersticial da heterocromatina parece ser conservado entre as poucas populações de *Astyanax altiparanae* já caracterizadas pelo bandamento C (PAGANELLI, 1990; DANIEL-SILVA e ALMEIDA-TOLEDO, 2001; FERNANDES e MARTINS-SANTOS, 2004).

As regiões organizadoras de nucléolos na população do alto rio Tibagi estão localizadas na porção terminal de sete pares cromossômicos de dois braços (RONs múltiplas) enquanto que na população do alto rio Iguaçu foram evidenciadas RONs em apenas um par cromossômico subtelocêntrico (RONs simples), também na região telomérica. A presença de um único par organizador nucleolar, situação notadamente ancestral para este caráter, pela primeira vez é comprovada em *Astyanax altiparanae* ao nível de localização de rDNA 18S, sendo mais comum a presença de múltiplos organizadores nucleolares envolvendo vários cromossomos do complemento como o que foi aqui verificado em *A. altiparanae* da população do alto rio Tibagi e em outras localidades da mesma bacia hidrográfica (TAKAHASHI, 1995) e de outras localidades (PAGANELLI, 1990; DANIEL-SILVA, 1996). FERNANDES e MARTINS-SANTOS (2004) destacam que sinais GC brilhantes pelo emprego do corante cromomicina

indicam que provavelmente mais do que um par de cromossomos portadores de RONS devem existir em estado de inativação em uma população de *A. altiparanae* por eles estudados no rio Paraná, resultado que deve ser testado com a hibridação *in situ* com sondas de rDNA maior.

A correlação das regiões organizadoras de nucléolos com sítios GC ricos tem sido relativamente comum entre os peixes, embora a coloração com fluorocromos GC específicos não pode ser considerado um método para a direta determinação dos genes ribossomais, mas de heterocromatinas GC ricas (ARTONI *et al.*, 1999).

Apesar da variação interpopulacional verificada para a localização do DNA ribossomal maior em relação às seqüências 5S as duas populações tiveram um único par cromossômico submetacêntrico comparável marcado na região pericentromérica (Figura 7e, f). No trabalho de ALMEIDA-TOLEDO, *et al.* (2002) também foi encontrada marcação em um par cromossômico submetacêntrico na região pericentromérica, proposto conservado para diferentes espécies de *Astyanax* em relação à localização do rDNA menor.

Por outro lado, a localização de genes ribossomais da subunidade 18S indica que processos de diversificação cariotípica, a exemplo de transposição e translocação, estão atuando diferentemente entre as populações analisadas, reforçando a hipótese de alopatria recente. Diferentemente a outra família de DNA ribossomal da subunidade menor (5S) aponta para certo conservadorismo muito provavelmente em nível de gênero, proporcionada pela sua localização pericentromérica no braço longo do par cromossômico portador destes cistrons.

5.2 COMPARAÇÕES MORFOMÉTRICAS E INTEGRAÇÃO COM DADOS CARIOTÍPICOS EM *A. altiparanae* DO ALTO RIO TIBAGI E ALTO RIO IGUAÇU

O gênero *Astyanax* integra uma assembléia de gêneros de peixes neotropicais, anteriormente alocados na subfamília Tetragonopterinae (GÉRY, 1977) e que recentemente foram colocados como gêneros *incertae sedis* por não apresentarem evidências consistentes para o monofiletismo (LIMA *et al.*, 2003).

Segundo BUCKUP, citado em LIMA *et al.* (2003), 86 espécies de *Astyanax* são nominadas, mas pobremente conhecidas, a exemplo de outros gêneros *incertae sedis* de Characidae.

Recentemente GARUTTI e BRITSKI (2000) revisaram algumas espécies de *Astyanax* e restringiram a distribuição de *A. altiparanae*, espécie nova e anteriormente identificada como *A. bimaculatus*, para a bacia do alto rio Paraná.

A exemplo de variações morfológicas interpopulacionais verificadas em *Astyanax scabripinnis* não serem atribuídas ao isolamento entre grandes bacias hidrográficas (CARAMASCHI, 1986), *Astyanax altiparanae* também evidenciam variações morfológicas inter e intrapopulacionais, porém creditadas a variações ambientais (GARUTTI e BRITSKI, 2000).

A análise das variáveis canônicas independentes de tamanho (AVC) das amostras populacionais de *Astyanax altiparanae* das duas localidades nas bacias do alto rio Tibagi e alto rio Iguaçu, revelou uma sobreposição dos escores individuais das medidas morfométricas de ambas as populações analisadas no espaço definido pelos dois primeiros eixos canônicos. O gráfico (Figura 8) mostra que ocorreu sobreposição entre as duas populações estudadas, isto significa que as duas populações não apresentaram diferenças morfológicas marcantes. O primeiro eixo canônico (CA1) concentrou a maior parte da variância dos dados, sendo responsável por 45,79% da variação, enquanto que o segundo eixo (CA2) explicou 11,67% da variação dos dados.

As variáveis que mais contribuíram na discriminação ao longo dos eixos 1 e 2 foram Comprimento do Pedúnculo Caudal (CPC), Comprimento da Maxila (CM),

Comprimento do Focinho (CF) e Altura do Pedúnculo Caudal (APC). Apenas os valores médios de CPC ($t=4,47$; $p<0,05$) e CM ($t=2,19$; $p<0,05$) foram significativamente diferentes entre as populações analisadas, sendo os maiores valores registrados para a amostra do rio Iguaçu (Tabela 1).

As diferenças e semelhanças morfológicas aqui verificadas para os dois eixos canônicos possibilitam supor tratar-se de uma única espécie com pequenas variações interpopulacionais. Estas variações podem ser dadas a variações ambientais assim como a polimorfismos populacionais, a exemplo de outras populações da mesma espécie em outras localidades. Diferentemente, SHIBATTA e ARTONI (2005) constataram a presença de um complexo de espécies através da análise de variáveis morfológicas canônicas em diferentes populações de *Astyanax aff. fasciatus* do alto rio Tibagi, dados corroborados pela análise cariotípica destas populações (ARTONI et al., *in press*).

MOREIRA-FILHO e BERTOLLO (1991), estudando seis populações de *Astyanax scabripinnis*, verificaram que algumas populações deste complexo de espécies podem ser identificadas por meio de análise de variáveis morfológicas e/ou cariotípicas enquanto outras se sobrepõem independentemente da distribuição geográfica nas bacias hidrográficas amostradas.

A análise combinada dos dados citogenéticos e morfológicos foram coincidentes na caracterização das duas populações de *Astyanax altiparanae* aqui estudadas, indicando distintos estoques populacionais provavelmente pertencentes à mesma espécie. Não se descarta, porém a possibilidade de marcadores moleculares mais específicos, por exemplo, indicarem se tratar de espécies distintas. Contudo, PRIOLLI *et al.* (2002) utilizando seqüências de DNA mitocondrial e marcadores RAPD, concluíram que uma amostra populacional de *Astyanax altiparanae* do rio Iguaçu no terceiro planalto paranaense não difere de amostras desta espécie provenientes de tributários do alto rio Paraná. No mesmo sentido, a análise morfológica destas mesmas populações confirmou tratar-se de uma única espécie e permitiu ampliar a distribuição natural de *A. altiparanae* (GRAÇA e PAVANELLI, 2002). Existe uma divergência entre estes autores em relação à presença de *A.*

altiparanae na bacia do rio Iguaçu, sugerindo, os primeiros, tratar-se de introdução recente e, os últimos, não definem entre introdução antrópica e/ou ancestralidade comum.

Com os dados do presente estudo, queremos apresentar ainda a hipótese de ocorrer diferentes estoques populacionais de *A. altiparanae* ao longo da bacia do rio Iguaçu como consequência da história de formação desta bacia, dos seus lagos pretéritos e da conexão com bacias adjacentes como a do alto rio Tibagi, Ribeira de Iguape e do próprio Paraná. Os achados de INGENITO, DUBOC e ABILHOA (2004), em especial o relato de *A. altiparanae* no alto rio Iguaçu, suportam a necessidade de melhor amostrar o rio Iguaçu e bacias adjacentes com o propósito de melhor interpretar a biogeografia regional e a distribuição destes peixes.

Na própria bacia do rio Tibagi a citogenética aponta para diferenças populacionais em *Astyanax altiparanae* e, a utilização de outras ferramentas em biologia evolutiva, assim como marcadores morfológicos, poderiam auxiliar a melhor caracterizar e interpretar este quadro também na bacia do rio Tibagi.

6. CONCLUSÕES

Frente aos dados cariotípicos e morfológicos obtidos para as duas amostras populacionais de *Astyanax altiparanae* das bacias do alto rio Tibagi e alto rio Iguaçu, foi possível concluir:

1. A macroestrutura cariotípica verificada apresenta tendência à manutenção do número diplóide basal para esta espécie, a exemplo do que ocorre em populações de *A. altiparanae* em outras bacias hidrográficas anteriormente estudadas, especialmente em relação ao número cromossômico diplóide.
2. Alterações cariotípicas interpopulacionais atribuídas a diferenças de tipos cromossômicos, auxiliares a citotaxonomia, foram observadas fundamentalmente em relação ao número de cromossomos submetacêntricos e acrocêntricos constatada na fórmula cariotípica da população do rio Tibagi ($6m+28sm+8st+8a$) e na população do rio Iguaçu ($6m+30sm+8st+6a$), refletida no número fundamental $NF=92$ e 94 , respectivamente.
3. Na diferenciação da macroestrutura cariotípica das populações analisadas ressalta-se a importância de rearranjos não robertsonianos a exemplo de inversões pericêntricas requeridos para explicar a variação de NF e constância do $2n$. Entre outros mecanismos de alterações cromossômicas podem ser destacados eventos de transposição e/ou translocações como dispersores de sítios de rDNA 18S no cariótipo. Os sítios de rDNA 5S apontam para certo conservadorismo muito provavelmente a nível de gênero.
4. Um polimorfismo de número e expressão de genes ribossomais verificado na população de *A. altiparanae* do alto rio Tibagi e não encontrado na população do alto rio Iguaçu que se mostrou mais conservada permite diferenciar citogeneticamente estas

populações e propõe que a condição de RON simples verificada para esta última população seja a condição ancestral para o caráter nesta espécie.

5. O padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva foi bastante discreto em relação a outros *Astyanax*. Contudo, não diferiu dos poucos resultados já estabelecidos para outras populações de *A. altiparanae* com bandas intersticiais e pericentroméricas em poucos cromossomos do complemento e no braço curto de outros da população do alto rio Tibagi.

6. A bem da conhecida variabilidade morfológica da espécie dada à associação com variáveis ambientais, uma forte sobreposição das variáveis canônicas analisadas indica uma relação de parentesco e unidade taxonômica ao nível de espécie. Além disso, alguns parâmetros morfométricos como altura e comprimento do pedúnculo caudal, comprimento do focinho e comprimento da maxila, individualizaram as populações.

7. Os dados cariotípicos e morfológicos obtidos não permitem maiores inferências a respeito da biogeografia histórica desta espécie nas localidades estudadas, mas indicam tratar-se de estoques populacionais distintos e, portanto, com pouca possibilidade de fluxo gênico no passado recente. Apontam ainda para uma história evolutiva mais complexa diante dos dados de literatura onde *A. altiparanae*, pertencentes a outras localidades das bacias dos rios Tibagi e Iguaçu, tem apresentado estrutura cariotípica diferenciada daquelas aqui relatadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM, 387p., 1997.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; BONILLO, C.; PORTO-FORESTI, F.; DANIEL-SILVA, M.F.Z. Conservação do par portador do rDNA5S e co-localização com os rDNAs principais em cinco espécies de *Astyanax* (PISCES, CHARACIDAE). **Resumos**. In: 48º Congresso Brasileiro de Genética, setembro, 2002.

ARTONI, R.F.; ALMEIDA, M.C. A singular diversidade dos peixes dos Campos Gerais: uma visão genética para abordagem conservacionista da região. In: DITZEL, C.H.M.; SAHR, C.L.L. **Espaço e cultura**: Ponta Grossa e os Campos Gerais. Ponta Grossa: Imprensa Universitária da UEPG, p.505–518, 2001.

ARTONI, R.; MOLINA, W.F.; BERTOLLO, L.A.C.; GALETTI Jr., P.M. Heterochromatin analysis in the fish species *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes) and *Leporinus elongatus* (Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, n. 22, p.1-6, 1999.

BARROS, F.L.R. de; ROSA, R.S. Variações morfológicas em populações de *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1868) das bacias costeiras do Rio Grande do Sul (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Cnesterodontini). **Acta Biologica Leopoldensia**, v.20, n.2, p.251-272, 1998.

BEMVENUTI, M.A. Diferenciação geográfica do peixe-rei *Odontesthes argentinensis* (Atherinopsidae) no extremo sul do Brasil, através da morfometria multivariada. **Atlântica**, v.22, p.71-79, 2000.

BEMVENUTI, M.A.; RODRIGUES, F.L. Análise comparativa entre técnicas morfométricas aplicadas a *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes) e *Odontesthes humenses* De Buen (Osteichthyes, Atherinopsidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, n.19, v.3, p.789-796, 2002.

BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Brazilian Journal of Genetics**, n.1: p.103-120, 1978.

BLACKITH, R.E.; REYMENT, R.A. **Multivariate morphometrics**. Academic Press, London, 410 p., 1971.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce de São Paulo: sistemática. In: **Poluição e Psicultura**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP – Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria de Agricultura, p. 79-108, 1972.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. 3. ed. Minas Gerais: Ministério da Irrigação – CODEVASF, 1998.

CAMPELLO, F.D.; BEMVENUTI, M.A. Diferenciação morfométrica e osteológica entre *Ramnogaster arcuata* (Jenyns) e *Platanichthys platana* (Regan) (Teleostei, Clupeidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, n.19, v.3, p.757-766, 2002.

CARAMASCHI, E.P. **Distribuição da ictiofauna de riachos das bacias do Tietê e do Paranapanema, junto ao divisor de águas (Botucatu, SP)**. São Carlos, 1986. Tese de Doutorado. Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva. Universidade Federal de São Carlos.

CASSEMIRO, F.A. da S.; HAHN, N.S.; FUGI, R. Avaliação da dieta de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Osteichthyes, Tetragonopterinae) antes e após a formação do reservatório de Salto Caxias, estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum**, v.24, n.2, p.419-425, 2002.

CAVALCANTI, M.J.; LOPES, P.R.D. Morfometria comparada de *Ctenosciaena gracilicirrhus*, *Paralonchurus brasiliensis* e *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) pela análise multivariada de redes de treliças. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.7, n.4, p. 627-635, 1990.

CAVALCANTI, M. J.; LOPES, P.R.D. Análise morfométrica multivariada de cinco espécies de Serranidae (Teleostei: Perciformes). **Acta Biologica Leopoldensia**, v.15, n.1, p.53-64, 1993.

CECILIO, E.B.; AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO Jr., H.F.; PAVANELLI, C.S. Colonização ictiofaunística do reservatório de Itaipu e áreas adjacentes. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.14, n.1, p.1-14, 1997.

DANIEL-SILVA, M. de F.Z. **Estudos Citogenéticos Comparativos em Quatro Espécies do Gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. São Paulo, 1996. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo.

DANIEL-SILVA, M. de F.Z.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Chromosome R-banding pattern and conservation of a marker chromosome in four species, genus *Astyanax* (Characiformes, Tetragonopterinae). **Caryologia**, v.54, p. 209-215, 2001.

DE FRANÇA, V. O rio Tibagi no contexto hidrogeográfico paranaense. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: M.E., 2002.

DUJARDIN. **Bacwin Morphometrics**. Programa de Análise Morfométrica. 2002.

EIGENMANN, C.H. The American Characidae. **Memoirs of the Museum of Comparative Zoology Harvard**, v.43, n.4, p.311-428, 1927.

ELETROSUL - PARANÁ. **O Impacto Ambiental da ação do homem sobre a natureza**. AMA, 1977.

FAUAZ, G.; VICENTE, V.E.; MOREIRA-FILHO, O. Natural triploidy and B chromosomes in the neotropical fish genus *Astyanax* (Characidae). **Brazilian Journal of Genetics**, v.2, p.157-163, 1994.

FENOCCHIO, A.S.; VENERE, P.C.; CESAR, A.C.G.; DIAS, A.L.; BERTOLLO, L.A.C. Short term culture from solid tissues of fishes. **Caryologia**, v.44, p.161-166, 1991.

FERNANDES, C.A.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Hereditas**, v.141, p.1-5, 2004.

FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the Ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.72, n.4, p.297-353, 1981.

GARAVELLO, J.C.; PAVANELLI, C.S.; SUZUKI, H.I. Caracterização da ictiofauna do rio Iguaçu. In: AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo**. Maringá: EDUEM, p. 61-84, 1997.

GARAVELLO, J.C.; REIS, S.F. Análise das variáveis canônicas em caracteres quantitativos no gênero *Parotocinclus* Eigenmann e Eigenmann, 1889 (Pisces: Lorecariidae). **Ciência e Cultura**, n.40, v.9, p. 889-891, 1988.

GARAVELLO, J.C.; REIS, S.F.; STRAUSS, R.E. Discrimination and body form variation in three species of *Leporinus* Spix from rio Meta, Colombia (Ostariophysi: Anostomatidae). **Zoologischer Anzeiger**, v.227, p.93-97, 1991.

GARUTTI, V. **Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica**. São José do Rio Preto (SP), 1995. Tese (Livre-Docência). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS Série Zoologia**, n.13, p.65-88, 2000.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. T.F.H. Publications: 672 p, 1977.

GOODLAND, R. **Usina Hidrelétrica Foz do Areia**: reconhecimento do impacto ambiental. Curitiba, COPEL, 1975.

GRAÇA, W.J.; PAVANELLI, C.S. *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Osteichthyes, Characidae) in the Iguaçu River basin. **Acta Scientiarum**, v.24, n.2, p.451-453, 2002.

GROSS, C.M.; SCHNEIDER, C.H.; MATIELLO, M.C. de A.; LEITE, M. de L.; BERTOLLO, L.A.C.; ARTONI, R.F. Population structure, fluctuating asymmetry and genetic variability in an endemic and highly isolated *Astyanax* fish population (Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n.24, p.1-9, 2004.

HAMMER; HARPER. **Past 1.3**. Programa de Análise Estatística, 2004.

HATANAKA, T. **Estudos de marcadores cromossômicos e moleculares no peixe *Prochilodus marggravii* (Prochilodontidae), uma espécie de interesse econômico no rio São Francisco**. São Carlos (SP), 2000. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver-stining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1- step method. **Experientia**, v.36, p.1014-1015, 1980.

INGENITO, L.F.S.; DUBOC, L.F.; ABILHOA, V. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da bacia do alto rio Iguaçu, Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia da UNIPAR**, v.7, p.23-26, 2004.

JUSTUS, J.O. Geologia da região sul. In: MESQUITA, O.V. **Região Sul**. IBGE, Rio de Janeiro. p.189-218, 1990.

KANTEK, D.L.Z; FENOCCHIO, A.S.; CESTARI, M.M. Cytogenetic Characterization and NOR Polymorphism in *Astyanax* sp. C (Tetragonopterinae, Characidae) from First Plateau of Iguaçu River (Paraná State, Brazil). **Cytologia**, v.68, n.1, p.19-24, 2003.

KASAM, D.D.; SATO, T., YAMAOKA, K. Landmark – based morphometric analysis of the body shape of two sympatric species, *Ctenopharynx pictus* and *Otopharynx* sp. “heterodon nankhumba” (Teleostei: Cichlidae), from Lake Malawi. **Ichthyological Research**, v.49, p.340-345, 2002.

KAVALCO, K.F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. **Caryologia**, v.56, n.4, p.453-461, 2003.

LEE, M.R.; ELDER, F.F.B. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.26, p.36-40, 1980.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric positions on chromosomes. **Hereditas**, v.52, p.201-220, 1964.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; SILVA, J.F.P.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. Genera incertae sedis in Characidae. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.;

FERRARIS, Jr., C.J., **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Edipucrs, p. 106-169, 2003.

LOBON-CERVIÁ, J.; BENNEMANN, S.T. Temporal trophic shifts and feeding diversity in two sympatric, neotropical omnivorous fishes: *Astyanax bimaculatus* and *Pimelodus maculatus* in rio Tibagi (Paraná, southern Brazil). **Archives of Hydrobiology**, v.149, n.2, p.285-306, 2000.

LUCENA, C.A.S. **Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes)**. São Paulo, 1993. Tese de Doutorado apresentada à Universidade de São Paulo.

MAACK, R. **Geografia Física do Estado do Paraná**. 2 ed. Curitiba: Secretaria da Cultura e Esporte do Governo do Estado do Paraná, 442p, 1981.

MAGALHÃES, P. C. **Hidrologia Superficial em Engenharia Hidrológica**. UFRJ/ABRH, 1989.

MAISTRO, E.L.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Occurrence of macro B chromosome in *Astyanax scabripinnis paranae* (Pisces, Characiformes, Characidae). **Genetica**, v.87, p.101-106, 1992.

MANTOVANI, M.; ABEL, L.D.S.; MESTRINER, C.A.; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, v.109, p.161-168, 2000.

MARTINS, C.; GALETTI Jr., P.M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* Fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v.7, p.363-367, 1999.

MATOSO, D.A.; VICARI, M.R.; ALMEIDA, M.C.; SHIBATTA, O.A.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C.; ARTONI, R.F. Karyotypic studies in the characidae fish, genus *Astyanax*. An endemic and highly isolated population of *Astyanax* sp. **Cytologia**, v.67, p.123–128, 2002.

MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA (MME). **Diagnóstico e Planejamento da Utilização dos Recursos Hídricos da Bacia do Iguaçu**. Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais, v.1, 33p., 1990.

MIZOGUCHI, S.M.H.; MARTINS-SANTOS, I.C. Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax “scabripinnis”* (Pisces, Characidae) from Maringá region. PR, Brasil. **Genetics and Molecular Biology**, v.1, p.55-61, 1998.

MOREIRA-FILHO, O. **Análises cariotípicas e morfológicas sobre a diversidade no “complexo” *Astyanax scabripinnis* (Jenys, 1842) (Pisces, Characidae, Tetragonopterinae)**. São Carlos, (SP), 1989. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. **Brazilian Journal of Genetics**, v.14, p.331-357, 1991.

MOREIRA-FILHO, O.; GALETTI Jr, P.M.; BERTOLLO, L.A.C. B chromosomes in the fish *Astyanax scabripinnis* (Characidae, Tetragonopterinae): An overview in natural populations. **Cytogenetics and Genome Research**, v.106, p.230-234, 2004.

MORELLI, S.; BERTOLO, L.A.C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; TOLEDO FILHO, S.A. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic Variability. **Caryologia**, v.36, n.3, p.235-244, 1983.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.

OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; BRITSKI H.A.; TOLEDO-FILHO, S.A. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Brazilian Journal of Genetics**, v.11, p.577-624, 1988.

ORSI, M.L.; SHIBATTA, O.A.; SILVA-SOUZA, A.T. Caracterização biológica de populações de peixes do rio Tibagi, localidade de Sertanópolis. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: M.E., 2002.

PACHECO, R.B. **Estudos citogenéticos em diferentes populações de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Tetragonopterinae)**. Londrina, 2001. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina.

PACHECO, R.B.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Cytotypes and Multiple NORs in an *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). **Chromosome Science**, v.5, p.109-114, 2001.

PAGANELLI, H.H. **Diversidade cromossômica do gênero *Astyanax* com referência a *Astyanax bimaculatus* (Linneaus, 1758). Considerações taxonômicas e evolutivas**. São Carlos, 1990. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos.

PERES, P. R. Neto; VALENTIN, J. L.; FERNANDEZ, F. **Tópicos em tratamentos de dados biológicos**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1995.

PINESE, J.P.P. Síntese geológica da bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: M.E., 2002.

PORTO, F.E.; MARTINS-SANTOS, I.C. Diversidade Cariotípica em populações de (Pisces, Characidae) das bacias do rio Paraná e Iguaçu. In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA E GENÉTICA DE PEIXES, IX 2002. **Resumos**. CIT 3, 2002.

PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; JÚLIO Jr., H.F.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A.V.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu river, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.4, p.421-430, 2002.

REIS, S.F. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.5, n.4, p.571-580, 1988.

REIS, S.F.; CUNHA, R.A.; GARAVELLO, J.C.; ABE, A.S. Discriminação pela forma em relação ao tamanho: um exemplo com peixes do gênero *Leporinus*. **Ciência e Cultura**. v.39, p.757-761, 1987.

REIS, S.F.; PESSÔA, L.M.; STRAUSS, R.E. Application of size-free canonical discriminant analysis to studies of geographic differentiation. **Brazilian Journal of Genetics**, v.13, n.3, p.509-520, 1990.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. **Check List of Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. 742 p.

RIGA, F.; TROCCHI, V.; RANDI, E.; TOSO, S. Morphometric differentiation between the Italian hare (*Lepus corsicanus* De Winton, 1898) and the European brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778). **Journal Zoology of London**, v.253, p.241-252, 2001.

ROBAINA, T.F.; CESTARI, M.M. Estudos citogenéticos em *Astyanax* sp. B (Characidae) do riacho cachoeira – Petrocix, São Mateus do Sul (PR). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA. GENÉTIC AND MOLECULAR BIOLOGY, 44, 1998. **Resumos**. A75, 1998.

SAMPAIO, F.A.A. **Estudos taxonômicos preliminares dos Characiformes (Teleostei, Ostariophysi) da Bacia do Rio Iguaçu, com comentários sobre o endemismo desta fauna**. São Carlos (SP), 1988. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos.

SCHWEIZER, D. Simultaneous fluorescent staining of R-bands and specific heterochromatic regions (DAPI bands) in human chromosomes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.27, p.190-193, 1980.

SEVERI, W.; CORDEIRO, A.A.M. **Catálogo de peixes da Bacia do Rio Iguaçu**. Curitiba: IAP/GTZ, 128p, 1994.

SCHAEFER, S.A. Morphometric investigation in Cyprinid biology. In: WINFIELD, I.J., NELSON, G. **Cyprinid fishes: systematics and exploitation**. London: Chapman e Hall, 1991.

SHIBATTA, O.A., ARTONI, R.F. Sobre a identidade das populações alopátricas de *Astyanax* (Characiformes, Characidae) das formações Furna 1 e Furna 2 do Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**. v.11, n.2, p.7-12, 2005.

SHIBATTA, O.A., GARAVELLO, J.C. Estudo da variação geográfica em *Salminus hilarii* Valenciennes, 1849, das Bacias do alto Paraná e São Francisco, através da análise morfométrica multivariada em componentes principais. **Naturalia**, n.18, p.109-116, 1993.

SHIBATTA, O. A.; HOFFMANN, A. C. Variação geográfica em *Corydoras paleatus* (Jenyns) (Siluriformes, Callichthyidae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.22, n. 2, p. 366-371, 2005.

SHIBATTA, O.A.; ORSI, M.L.; BENNEMANN, S.T; SILVA-SOUZA, A.T. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: M.E., 2002.

SOUZA, I.L; MOREIRA-FILHO, O.M. Cytogenetic diversity in the *Astyanax scabripinnis* species complex (Pisces, Characidae). I. Allopatric distribution in a small stream. **Cytologia**, v.60, p.1-11, 1995.

STIPP, N.A. Principais tipos de solos da bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: M.E., 2002.

STRAUSS, R.E.; BOOKSTEIN, F.L. The truss: body form reconstructions in morphometrics. **Systematic Zoologic**, v.31, p.113-135, 1982.

STRIPECK, R.; PINTA, M.T.N.; HACKEL, C.; SAZIMA, I. O cariótipo de *Astyanax eigenmanniorum* (Osteichthyes, Characidae). In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOLOGIA, 1985. **Resumos**. p. 173-174, 1985.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.74, p.304-306, 1972.

TAKAHASHI, E.K. **Análise citogenética de *Astyanax bimaculatus* coletados no ribeirão Três Bocas – Londrina**. Londrina, 1995. Monografia, Universidade Estadual de Londrina.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S.; TAYLOR, L. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A guide to methods and applications**. Academic Press, New York/London, 1990.

ZAWADZKI, C.H.; RENESTO, E.; BINI, L.M. Genetic and morphometric analysis of three species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the Rio Iguaçu basin (Brazil). **Revue Suisse de Zoologie**, 106, 91-105. 1999.